

Entwicklung neuer Inhibitoren für das Ras-Protein und dessen onkogene Mutanten auf Basis von Cyclenderivaten



Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (*Dr. rer. nat.*)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
- Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Thorsten Graf

aus Fürth in Bayern

Regensburg

2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2003 bis Mai 2006 am Institut für Biophysik und Physikalischer Biochemie und am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg angefertigt.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 31.05.2006

Das Promotionskolloquium fand statt am: 27.06.2006

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Ralph Witzgall (Vorsitzender)
Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer (1. Gutachter)
Prof. Dr. Burkhard König (2. Gutachter)
Prof. Dr. Eike Brunner (3. Prüfer)

Meinen Eltern

| | | |
|----------|---|----------|
| 1 | <i>EINLEITUNG</i> | 1 |
| 1.1 | Guaninnukleotid-bindende Proteine und ihre Funktion in der Signaltransduktion am Beispiel des Ras-Proteins | 1 |
| 1.2 | Konformationen des Ras-Proteins..... | 3 |
| 1.3 | Mutationen im Ras-Protein und deren Auswirkungen | 4 |
| 1.4 | Das Ras-Protein als Zielmolekül der Tumorbekämpfung | 5 |
| 1.5 | Die Verwendung von Zn ²⁺ -Cyclen und dessen Derivaten in der molekularen Erkennung | 6 |
| 1.6 | Zielsetzung..... | 8 |
| 2 | <i>MATERIALIEN UND GERÄTE</i> | 9 |
| 2.1 | Chemikalien | 9 |
| 2.2 | Häufig verwendete Puffer-Lösungen | 9 |
| 2.3 | Plasmide..... | 10 |
| 2.4 | Bakterienstämme..... | 10 |
| 2.5 | Antibiotika und Nährmedia | 10 |
| 2.6 | Enzyme | 12 |
| 2.7 | Standard | 12 |
| 2.8 | Verbrauchsmaterial und Zubehör | 12 |
| 2.9 | Verwendete Chromatographiesäulen | 13 |
| 2.10 | Geräte | 13 |
| 2.11 | Auswertungs- und Darstellungssoftware..... | 14 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3 | METHODEN UND SYNTHESSEN | 15 |
| 3.1 | Expression und Reinigung von Proteinen | 15 |
| 3.1.1 | Expression und Reinigung von unmarkiertem Ras..... | 15 |
| 3.1.2 | Expression und Reinigung von ¹⁵ N-markiertem Ras(wt) | 16 |
| 3.1.3 | Expression und Reinigung von ¹⁵ N-markiertem Ras(T35A) | 17 |
| 3.2 | Proteinbiochemische Methoden | 19 |
| 3.2.1 | Bestimmung der Proteinkonzentration mittels HPLC..... | 19 |
| 3.2.2 | Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese..... | 19 |
| 3.2.3 | Nukleotidaustausch | 20 |
| 3.2.3.1 | Nukleotidaustausch zu GTP | 20 |
| 3.2.3.2 | Nukleotidaustausch zu GppNHp oder mGppNHp | 20 |
| 3.3 | Messmethoden | 21 |
| 3.3.1 | Kernspinresonanz-Spektroskopie..... | 21 |
| 3.3.1.1 | Temperatureichung und Referenzierung | 21 |
| 3.3.1.2 | Messung von 2D-NMR Spektren | 21 |
| 3.3.1.3 | NMR-Spektren zur Zuordnung der synthetisierten Moleküle | 23 |
| 3.3.1.4 | Aufnahme von <i>WaterLOGSY</i> -Spektren | 26 |
| 3.3.1.5 | Messung von ³¹ P-NMR-Spektren..... | 26 |
| 3.3.1.6 | Messung der ³¹ P-NMR-Spektren zur Bestimmung der T ₁ - Relaxationszeit der Nukleotidphosphate | 27 |
| 3.3.2 | Fluoreszenzspektroskopie..... | 27 |
| 3.4 | Auswertung der NMR- und Fluoreszenz-Daten..... | 28 |
| 3.4.1 | Bestimmung der Parameter von ³¹ P-Resonanzlinien | 28 |
| 3.4.2 | Simulation der T ₁ -Relaxationszeiten..... | 29 |
| 3.4.3 | Berechnung von Cu-P-Abständen | 30 |
| 3.4.4 | Berechnung der Dissoziationskonstanten aus NMR-Messungen | 31 |
| 3.4.5 | Bestimmung der Dissoziationskonstanten aus Fluoreszenzspektren | 33 |
| 3.5 | Moleküldynamikrechnungen | 34 |
| 3.6 | Organische Synthesen..... | 35 |
| 3.6.1 | Allgemeine Angaben | 35 |
| 3.6.2 | Synthese der Verbindungen | 37 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4 | ERGEBNISSE | 71 |
| 4.1 | Expression von isotoopenmarkierten Proteinen | 71 |
| 4.2 | Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen | 73 |
| 4.2.1 | Einführung | 73 |
| 4.2.2 | Untersuchungen an Ras(T35A)..... | 75 |
| 4.2.3 | Untersuchungen an Ras(wt)·mGppNHp | 79 |
| 4.2.4 | Untersuchungen an Ras(wt)·mGDP | 81 |
| 4.3 | NMR-Spektroskopische Untersuchungen | 84 |
| 4.3.1 | Untersuchung der Bindung von Cu ²⁺ -Cyclen an Ras(wt)·GppNHp und ausgewählte Mutanten mit Hilfe der ³¹ P-NMR-Spektroskopie | 84 |
| 4.3.2 | Untersuchung der Bindung von Cu ²⁺ -Cyclen an Ras(wt)·GDP und Ras(T35A)·GTP..... | 88 |
| 4.3.3 | Bestimmung des Abstands des Cu(II)-Ions zu den einzelnen Phosphorkernen des Nukleotids..... | 90 |
| 4.3.3.1 | Berechnung der Bindungskonstante | 90 |
| 4.3.3.2 | Relaxationszeitmessungen | 91 |
| 4.3.4 | Untersuchung der Bindungsstellen mit Hilfe von 2D-NMR- Experimenten an ¹⁵ N-markiertem Ras(T35A)·GppNHp | 93 |
| 4.3.4.1 | Zuordnung der Signale von ¹ H- ¹⁵ N-NMR-Experimenten mit Hilfe von Ras(T35S)·GppNHp | 93 |
| 4.3.4.2 | Titration von Ras(T35A)·GppNHp mit Cu ²⁺ -Cyclen..... | 94 |
| 4.3.4.3 | Titration von Ras(T35A)·GppNHp mit Zn ²⁺ -Cyclen | 97 |
| 4.4 | Moleküldynamikrechnungen | 105 |
| 4.5 | Synthese der Verbindungen | 111 |
| 4.5.1 | Auswahl der Zielmoleküle..... | 111 |
| 4.5.2 | Synthese der Verbindungen ohne Aminosäurereste | 114 |
| 4.5.3 | Synthese des Mant-markierten Zn ²⁺ -Cyclen..... | 115 |
| 4.5.4 | Synthese der Verbindungen mit einer Aminosäure als Rest | 117 |
| 4.5.5 | Synthese der Dipeptid-Derivate..... | 120 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.6 | Untersuchung der Cyclenderivate mittels <i>WaterLOGSY</i> | 126 |
| 4.6.1 | Einführung | 126 |
| 4.6.2 | Untersuchung der Bindung von Cyclenderivaten an Ras(T35A) | 126 |
| 4.6.3 | Verdrängungsstudien von Zn ²⁺ -Cyclen durch Cyclenderivate an Ras(T35A) | 131 |
| 5 | <i>DISKUSSION</i> | 133 |
| 5.1 | Expression von ¹⁵ N-markierten Ras-Proteinen | 133 |
| 5.2 | Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen | 134 |
| 5.3 | NMR-Spektroskopische Untersuchungen | 138 |
| 5.4 | Moleküldynamikrechnungen | 144 |
| 5.5 | Synthese der Verbindungen | 147 |
| 5.6 | <i>WaterLOGSY</i> -Untersuchungen | 151 |
| 5.7 | Ausblick..... | 152 |
| 6 | <i>ZUSAMMENFASSUNG</i> | 153 |
| 7 | <i>LITERATURVERZEICHNIS</i> | 155 |
| 8 | <i>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</i> | 162 |
| 9 | <i>ANHANG</i> | 165 |

1 Einleitung

1.1 Guaninnukleotid-bindende Proteine und ihre Funktion in der Signaltransduktion am Beispiel des Ras-Proteins

Die Übertragung von Informationen spielt nicht nur in der heutigen Gesellschaft eine tragende Rolle, auch im Lebewesen selbst werden täglich große Mengen von Informationen und Signalen empfangen, gebündelt und weitergeleitet. Dabei ist die Übertragung eines Signals durch die Zellmembran einer der wichtigsten Vorgänge, der zum Zellwachstum, zur Zellteilung, zur Proliferation und sogar zur Apoptose führen kann. Um solch ein Signal von außerhalb der Zellmembran bis in den Zellkern weiterzuleiten, haben Zellen während der Evolution verschiedene Signaltransduktionswege entwickelt. In diesen Kaskaden fungieren Guaninnukleotid-bindende (GNB) Proteine als wichtige molekulare Schalter. Diese so genannten GNB-Proteine werden in fünf Superfamilien eingeteilt.

Die dazu gehörige Ras-Superfamilie (Ras von *rat sarcoma*) mit ihren über 100 bekannten Proteinen ist in neun Unterfamilien eingeteilt. Diese Proteine besitzen alle die Fähigkeit, Guaninnukleotide zu binden und haben ein Molekulargewicht von 20 bis 25 kDa. Außerdem besitzen sie alle die Eigenschaft, mittels intrinsischer Hydrolyse das gebundene GTP durch Abspaltung des endständigen Phosphats in GDP zu überführen. Daher werden die Ras-homologen Proteine auch kleine GTPasen genannt. In ihrer Funktion als molekularer Schalter wechseln sie zwischen einem aktiven und einem inaktiven Zustand. Im inaktiven „aus“ Zustand ist GDP an die Proteine gebunden. Durch den Austausch von GDP zu GTP werden die Proteine in den aktiven „ein“ Zustand überführt. Nach dieser Aktivierung binden Effektoren mit hoher Affinität an die Proteine. Die Stelle, an der das Guaninnukleotid bindet, ist innerhalb der gesamten Ras-Superfamilie homolog und wird als Nukleotid-Bindedomäne bezeichnet.

Das humane H-Ras selbst besteht aus 189 Aminosäuren und hat eine Molekülmasse von 21 kDa. Die Sekundärstruktur ist aus 5 α -Helices und 6 β -Faltblättern aufgebaut. Das Ras-Protein besitzt einen P-Loop (AS 10 - 18), der

in die Bindung des Nukleotids und des Mg(II)-Ions involviert ist. Zudem besitzt es mit der Schalter I Region (AS 30 - 38) und der Schalter II Region (AS 60 - 72) zwei wichtige Regionen, die für die Eigenschaft als molekularer Schalter zuständig sind (Milburn *et al.* 1990). Ras wird als biologisch inaktives Protein in der Zelle exprimiert. Um es biologisch zu aktivieren, d.h. in der Plasmamembran zu verankern, wird das Cystein in der CAAX-Sequenz des C-terminalen Endes S-farnesyliert (Wittinghofer & Waldmann 2000). Zusätzlich werden andere Cysteine im Bereich des C-Terminus in Palmitoylsäurethioester umgewandelt. Das dementsprechend mit dem C-Terminus in der Zellmembran verankerte Ras-Protein kann anschließend durch GEFs (**Guaninnucleotide Exchange Factors**), wie Cdc25 oder SOS, aktiviert und durch GAPs (**GTPase Accelerating Proteins**), wie p120GAP oder NF1 deaktiviert werden (**Abb. 1.1**).

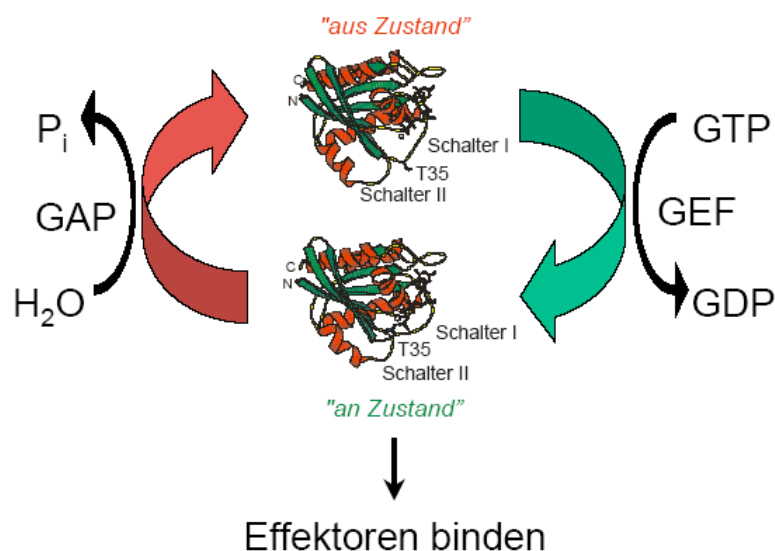


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Aktivierung und Deaktivierung von Ras mittels Guaninnukleotid Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase aktivierenden Proteinen (GAPs). Dargestellt sind die Röntgenstrukturen von H-Ras(wt)-GDP (oben, Tong *et al.* 1991) und H-Ras(wt)-GppNHp (unten, Pai *et al.* 1990).

Ist das Ras-Protein aktiviert, kann es andere Proteine, wie RalGDS, Raf-1, PI3K, Byr2, AF6 oder Nore1 (Herrmann & Nassar 1996, C. Herrmann 2003) binden. Dadurch werden diese Effektoren aktiviert und geben das Signal von Protein zu Protein in sogenannten Signaltransduktionskaskaden, wie z. B. der MAP-Kinase (**Mitogen Activated Protein kinase**) Kaskade weiter.

1.2 Konformationen des Ras-Proteins

Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, liegt das Ras-Protein in der Zelle in zwei Konformationen vor: in der GDP-gebundenen (Tong *et al.* 1991), inaktiven und in der GTP-gebundenen, aktiven Konformation (Pai *et al.* 1990). Geyer *et al.* (1996) konnte mit Hilfe der ^{31}P -NMR-Spektroskopie am Nukleotid des Ras(wt)-GppNHp-Komplexes (GppNHp ist ein GTP Analog) zeigen, dass die aktive Konformation des Ras-Proteins zusätzlich in zwei konformationellen Zuständen vorliegt. Allerdings basierte die Zuordnung der ^{31}P -Signale ursprünglich auf den chemischen Verschiebungen des freien Nukleotids und wurde erst später durch ^{31}P -NOESY-Experimente korrigiert (Spoerner *et al.* 2005B). Geyer *et al.* (1996) konnten zeigen, dass die Signale des α -Phosphats und des γ -Phosphats, in der Veröffentlichung von 1996 noch als β -Phosphat bezeichnet, aufgespalten vorliegen. Dieses Phänomen war der Beweis für die Existenz von zwei Zuständen in der aktiven, GTP-gebundenen Konformation, einem Zustand 1 und einem höher populierte Zustand 2, die sich im thermodynamischen Gleichgewicht befinden.

Weitere Untersuchungen mit GAP-334 zeigten, dass der Zustand 2 nach Bindung von GAP-334 an das Ras-Protein vollständig in die Konformation des Zustands 1 übergeht. Untersuchungen am Ras-Effektor Raf-RBD zeigten dagegen, dass die Signale des Zustands 1 nach der Bindung der Raf-RBD nicht mehr detektierbar sind. Daher wurde gefolgert, dass die Konformation des Zustands 2 der Struktur entspricht, an die Effektoren mit hoher Affinität binden können.

Ford *et al.* (2005) vermuten zudem, dass die „offene“ Struktur des Zustands 1 der Struktur ähnelt, wie sie im Komplex mit GEFs wie SOS vorliegt. Die dazu veröffentlichte Struktur zeigt Ähnlichkeiten zu der Struktur des Ras-SOS-Komplexes nach dem Austausch von GDP zu GTP, bevor das Nukleotid fest in das Protein eingebettet wird. Ye *et al.* (2005) konnten anhand der Struktur von M-Ras-GppNHp, das sich hauptsächlich in der Konformation des Zustand 1 befindet, diese „offene“ Struktur des Zustands 1 bestätigen.

In früheren Hochfeld EPR und ^{31}P -NMR-Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass das Ras-Protein auch in der GDP-gebundenen, inaktiven Form in zwei verschiedenen konformationellen Zuständen vorliegt (Rohrer *et al.* 2001).

1.3 Mutationen im Ras-Protein und deren Auswirkungen

Die Einführung von Mutationen wird in der Biologie oft verwendet, um die Funktion einzelner Aminosäuren im Protein genauer kennenzulernen. Auch am Ras-Protein wurden in der Vergangenheit viele Mutationsstudien durchgeführt, um deren Auswirkungen studieren zu können. Dabei spielt die ^{31}P -NMR-Spektroskopie am Nukleotid des Ras-Nukleotid-Komplexes eine große Rolle für die Identifizierung der zwei Zustände in der aktiven GppNHp-gebundenen Form. In Tabelle 1.1 sind zahlreiche Beispiele für Mutationen im Ras-Protein im Bereich des gebundenen Nukleotids zusammengefasst, die mit ^{31}P -NMR an Ras-GppNHp-Komplexen durchgeführt wurden. Zudem wird kurz erläutert, welche Auswirkungen sie auf die zwei Zustände und eventuell auf die Funktionen des Proteins besitzen.

| Mutation | Publikation | Auswirkung |
|------------|--|---|
| G12D | Geyer <i>et al.</i> 1996 Spoerner <i>et al.</i> 2004 | Verschiebung des konformationellen Gleichgewichts zum Zustands 1 hin; Ras wird onkogen |
| G12V | Geyer <i>et al.</i> 1996 | Leichte Verschiebung des konformationellen Gleichgewichts zum Zustands 1 hin; Ras wird onkogen |
| S17A | John <i>et al.</i> 1993 | Stabilisierung des Zustands 1; Verlust der Hydrolyseeigenschaften |
| V29G | Spoerner <i>et al.</i> 2004 | Stabilisierung des Zustands 1 |
| V29G/I36G | Spoerner <i>et al.</i> 2004 | Stabilisierung des Zustands 1; Herabgesetzte Affinität zu Effektoren |
| Y32F | Spoerner <i>et al.</i> 2004 | Leichte Verschiebung des konformationellen Gleichgewichts zum Zustands 1 hin |
| Y32R | Geyer <i>et al.</i> 1996 Spoerner <i>et al.</i> 2004 | Leichte Verschiebung des konformationellen Gleichgewichts zum Zustands 1 hin; Herabgesetzte Affinität zu Effektoren |
| Y32W | Spoerner <i>et al.</i> 2004 | Stabilisierung des Zustands 1; Herabgesetzte Affinität zu Effektoren |
| Y32C/C118S | Spoerner <i>et al.</i> 2004 | Stabilisierung des Zustands 1 |
| T35A | John <i>et al.</i> 1993 Geyer <i>et al.</i> 1996 Spoerner <i>et al.</i> 2004 | Verlust der Hydrolyseeigenschaften; Stabilisierung des Zustands 1; Herabgesetzte Affinität zu Effektoren |
| T35S | Spoerner <i>et al.</i> 2001 Spoerner <i>et al.</i> 2004 | Stabilisierung des Zustands 1; Herabgesetzte Affinität zu Effektoren; <i>partial loss-of-function mutant</i> |
| I36G | Spoerner <i>et al.</i> 2004 | Stabilisierung des Zustands 1 |
| Y40C | Spoerner <i>et al.</i> 2004 | Stabilisierung des Zustands 1; Herabgesetzte Affinität zu Effektoren; <i>partial loss-of-function mutant</i> |
| G60A | Ford <i>et al.</i> 2005 | Reduzierte Hydrolyserate von GTP; Stabilisierung des Zustands 1; Herabgesetzte Affinität zu Effektoren |

Tab. 1.1: Mutationen im Ras-Protein und deren Auswirkungen auf die zwei Zustände in der aktiven, GppNHp-gebundenen Konformation.

Onkogene Mutationen in den Positionen G12, G13 und Q61 führen zudem zu einer starken Reduktion der intrinsischen Hydrolyse und der GAP-Beschleunigung der Hydrolyse (M. Barbacid 1987) die zum Verbleiben des Ras-Proteins in einer ständig aktiven Konformation führt.

1.4 Das Ras-Protein als Zielmolekül der Tumorbekämpfung

Aufgrund der wachsenden Anzahl von Patienten, die an Krebs erkranken (www.Krebsinformationsdienst.de), rückt die Tumorbekämpfung immer mehr in den Blickpunkt bei der Erforschung neuer Medikamente. Dabei kann das Ras-Protein, das in über 30% aller menschlichen Tumorarten mutiert vorliegt (Wittinghofer & Nassar 1996), eine wichtige Rolle als Ziel für die Entwicklung neuer Antitumor-Medikamente spielen. Dazu ist es jedoch notwendig, mögliche Angriffspunkte für die Inhibierung von onkogenem Ras zu kennen. Wittinghofer und Waldmann (2000) haben in ihrer Veröffentlichung diese Ansatzpunkte näher beschrieben.

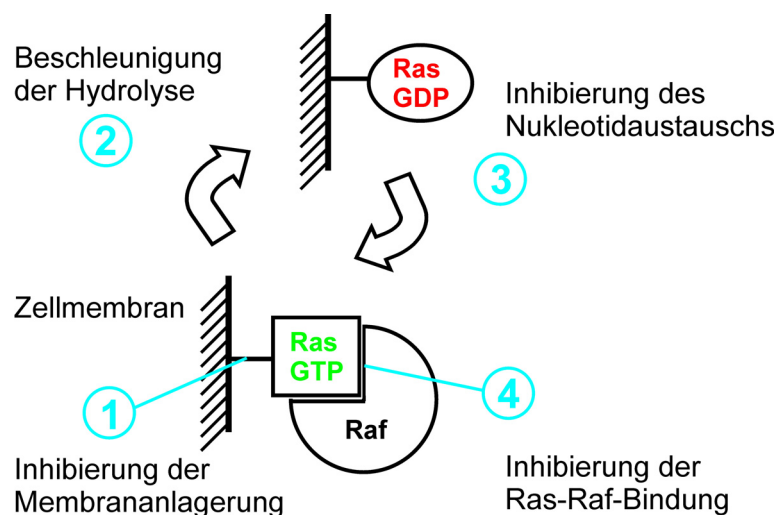


Abb. 1.2: Ansatzmöglichkeiten zur Inhibierung des Ras-Proteins in Tumorzellen.

Dabei zeigten sie vier mögliche Angriffspunkte auf, wie der molekulare Schalter, das Ras-Protein *in vivo* „ausgeschaltet“ werden kann. Einen ersten Ansatzpunkt stellt die Inhibierung der Membrananlagerung dar. Dazu kann sowohl die

Farnesyltransferase (Hancock *et al.* 1990), als auch die Palmitoyltransferase, die Palmitoyltransferase oder die Methyltransferase als Zielmolekül dienen. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Beschleunigung der intrinsischen GTP-Hydrolyse von onkogenem Ras mit Hilfe von Molekülen. Als drittes wird die Möglichkeit beschrieben, das Ras-Protein durch Inhibierung des Nukleotidaustauschs in der inaktiven, GDP-gebundenen Konformation verbleiben zu lassen, um die Signalweiterleitung zu unterbrechen.

Innerhalb dieser Arbeit stand ein vierter Angriffspunkt, die Inhibierung der Ras-Effektor-Bindung durch kleine Moleküle, im Vordergrund. Dieser zielt ebenfalls auf die Weiterleitung des Signals von Ras auf Effektoren wie Raf ab. In der Literatur sind dafür eine Vielzahl von kleinen Molekülen erwähnt, die die Ras-Raf-Bindung mit mehr oder weniger großem Erfolg inhibieren können. Die Moleküle, die dazu verwendet werden, reichen von kleinen Molekülen (Kato-Stankiewicz *et al.* 2002, Müller *et al.* 2004, Waldmann *et al.* 2004) über kleine Peptide (Barnard *et al.* 1998, Clark *et al.* 1996, Zeng *et al.* 2001,) bis hin zu langkettigen Polypeptiden (Xu & Luo 2002).

Eines der erfolgreichsten Moleküle stellt das Sulindac dar, das schon in der Tumorbekämpfung eingesetzt wird (F.M. Giardiello 1994). Dort scheint es die Ras-gesteuerte Signaltransduktion zu inhibieren (Thompson *et al.* 1997). Es wurde sogar bereits gezeigt, dass das Sulindacsulfid in der Lage ist, die Ras-Raf-Interaktion zu hemmen (Herrmann *et al.* 1998).

Es ist also möglich, die Ras-Effektor-Bindung mit kleinen Molekülen zu inhibieren. Daher ist es das Ziel, neue Moleküle zu finden, die ebenfalls diese Bindung schwächen oder sogar inhibieren können.

1.5 Die Verwendung von Zn^{2+} -Cyclen und dessen Derivaten in der molekularen Erkennung

Intermolekulare Wechselwirkungen sind äußerst wichtig für die Aktivität von Proteinen und Enzymen in ihrer biologischen Umgebung. Dabei spielen Salzbrücken, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen eine tragende Rolle für die Ausbildung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen,

Protein-Protein-Bindungen oder auch von Substratkomplexen (Reichenbach-Klinke & König 2002). Bei den Untersuchungen dieser Wechselwirkungen, der sogenannten molekularen Erkennung, wurde in den letzten Jahren vermehrt eine Klasse von azamakrozyklischen, Metallionen-bindenden Liganden verwendet. Einer der bedeutendsten Vertreter dieser Klasse ist das Cyclen (1,4,7,10-tetra-azacyclododecan), das Metallionen mit hoher Affinität bindet (Koike *et al.* 1996).

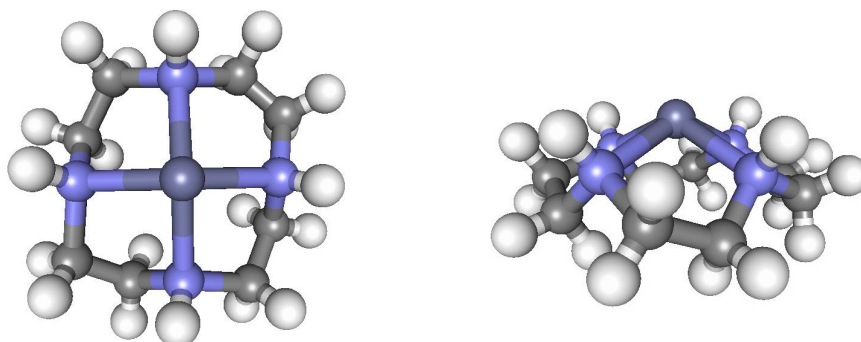


Abb. 1.4.1: Röntgenkristallstruktur von Zn^{2+} -Cyclen aus dem Tris- Zn^{2+} -Cyclen-p-Nitrophenolphosphat-Komplex von Kimura *et al.* (1997).

Die Verschiedenen $\text{M}^{2+/3+}$ -Cyclenderivate wurden dabei für die Bindung von Anionen (Reichenbach-Klinke & König 2002), für die Katalytische Esterhydrolyse (Koike *et al.* 1995, Kim & Lee 2000) und für die Phosphoresterhydrolyse (Norman & Cornelius 1982, Morrow *et al.* 1995, Baker *et al.* 1997) eingesetzt.

Das Zn^{2+} -Cyclen (**Abb. 1.4.1**) und dessen Derivate stellen die wohl am meisten untersuchten Vertreter dieser Klasse dar. Zn^{2+} -Cyclen findet unter anderem Anwendung in der molekularen Erkennung von Thymin und Urazil (Aoki & Kimura 2004) und von DNA-Fragmenten (König *et al.* 2001). Eingebettet in ein Polymer wird ein Zn^{2+} -Cyclenderivat sogar zur Erkennung von Nukleotiden und Nukleosiden in der HPLC verwendet (Aoki *et al.* 2004).

Außerdem werden die Zn^{2+} -Cyclene auch noch hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften von Phosphorsäureestern untersucht, die im sub-millimolaren Bereich liegt (Aoki & Kimura 2000, Aoki & Kimura 2002, Aoki *et al.* 2002 und Kruppa *et al.* 2006).

Erste ^{31}P -NMR Untersuchungen zeigten, dass Zn^{2+} -Cyclen hauptsächlich an den konformationellen Zustand 1 von Ras(wt)·GppNHp bindet und diesen dabei stabilisieren kann (Spoerner *et al.* 2005A).

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist vor allem die weitere Charakterisierung der Bindung von Cyclenderivaten an das Ras-Protein. Dazu stehen sowohl die Fluoreszenzspektroskopie an Ras-Mant-Nukleotid-Komplexen, als auch verschiedene Methoden der NMR-Spektroskopie zur Verfügung. Mittels der NMR-Spektroskopie können darüber hinaus die Lage möglicher Bindungsstellen identifiziert und die Bindungskonstanten der Cyclenderivate zu diesen Bindungsstellen bestimmt werden.

Ein weiteres Ziel ist es, eine Komplexstruktur des Zustands 1 des Ras-Proteins im Komplex mit einem Cyclen mittels HADDOCK zu berechnen. Diese bisher nur teilweise charakterisierte Struktur kann als Grundlage für Modifikationen am Cyclen verwendet werden.

Eine zusätzliche Aufgabe ist die Synthese neuer Cyclenderivate, die an das Ras-Protein binden. Möglicherweise kann dabei auch eine Verbindung hergestellt werden, die besser an das Ras-Protein bindet, als das schon bekannte Zn^{2+} -Cyclen.

2 Materialien und Geräte

2.1 Chemikalien

Die Grundausrüstung an Chemikalien wurde von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz), Acros Organics (Geel, Belgien), Roth (Karlsruhe), Pharma-Waldhof (Düsseldorf) und Sigma (Deisenhofen) im Reinheitsgrad *pro analysis* bezogen.

Die fluoreszierenden Mant-Nukleotidderivate wurden in der Abteilung I des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie nach der Methode von Hiratsuka (1983) hergestellt.

2.2 Häufig verwendete Puffer-Lösungen

| | |
|--------------------------------|--|
| Aufnahmepuffer: | 32 mM Tris/HCl pH 7.6, 5 mM EDTA, 2 mM DTE, 1 mM PMSF |
| Puffer C/2: | 32 mM Tris/HCl pH 7.6, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTE |
| Puffer D: | 64 mM Tris/HCl pH 7.6, 400 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 2 mM DTE, 0.1 mM GDP |
| Puffer ohne Mg ²⁺ : | 50 mM Tris/HCl pH 7.6, 2 mM DTE |
| Messpuffer A: | 40 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM MgCl ₂ , 2 mM DTE |
| Messpuffer B: | 40 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 10 mM MgCl ₂ , 2 mM DTE |
| Messpuffer C: | 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 2.5 mM MgCl ₂ , 0.5 mM DTE |
| Messpuffer D: | 10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 2 mM MgCl ₂ , 2 mM DTE |
| HPLC-Laufpuffer: | 100 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 6.4, 10 mM TBAB, 3 - 25% MeCN |

Alle verwendeten Puffer-Lösungen wurden in Millipore-Wasser angesetzt und steril filtriert.

2.3 Plasmide

Zur Expression der verschiedenen verkürzten (AS 1-166) und nicht verkürzten (AS 1-189) humanen H-Ras-Varianten wurden ptac-Vektoren verwendet (D. Kühlmann, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund).

2.4 Bakterienstämme

| | |
|--------------------------------|---|
| <i>Escherichia coli</i> CK600K | supE, hsdM ⁺ , hsdR ⁻ , kan ^R ; Hoffmann-Berling, Heidelberg |
|--------------------------------|---|

| | |
|-----------------------------------|--|
| <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) | F ⁻ , opmT, hsdS (r _B ⁻ , m _B ⁻), gal (38, 39); Stratagene, Heidelberg |
|-----------------------------------|--|

2.5 Antibiotika und Nährmedia

2.5.1 Antibiotika Stock-Lösungen

| | |
|----------------|---------|
| Ampicillin: | 100 g/l |
| Kanamycin: | 25 g/l |
| Carbenicillin: | 50 g/l |

Alle eingesetzten Antibiotika wurden von GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg) bezogen.

2.5.2 Minimal-Media

- Neidhardt-Medium (Neidhardt *et al.* 1974):

Basis-Medium:

100 ml/l 10xSalze (0.482 g/l K_2SO_4 , 29.2 g/l NaCl, 1.796 g/l KH_2PO_4 ,
1.074 g/l $MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 1 ml/l 1000xSpuren (9.557 g/l Titriplex I,
2.78 g/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 73.5 mg/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 53.1 mg/l
(NH_4) $_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 31.2 mg/l H_3BO_3 , 7.14 mg/l $CoCl_2 \cdot 6H_2O$,
2.5 mg/l $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 15.8 mg/l $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 2.5 mg/l $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$),
43.35 g/l Glucosemonohydrat in H_2O , pH 7.2

+ 80 ml/l 1 M MOPS/KOH pH 7.4

+ 1 g/l NH_4Cl (oder $^{15}NH_4Cl$)

anschließend steril filtriert

- New Minimal Medium (NMM nach Budisa *et al.* 1995):

Basis-Medium (0.9 l/l):

7.5 g/l Na_2HPO_4 , 3 g/l KH_2PO_4 , 0.5 g/l NaCl, 0.25 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,
14 mg/l $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; in H_2O , autoklaviert.

+ Spurenelemente-Prämix (10 ml/l):

20 ml/l 5xSL6 (0.5 g/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.15 g/l $MnCl_2$, 1.5 g/l H_3BO_3 ,
1 g/l $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 50 mg/l $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.1 g/l $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.15 g/l
 Na_2MoO_4 ; in H_2O , steril filtriert)

90 ml/l 10xSL4 (5.55 g/l EDTA, 2.22 g/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; in H_2O , steril
filtriert)

+ Glucose-Lösung (35 ml/l):

200 g/l Glucose in H_2O , steril filtriert

+ ^{15}N -Ammoniumchlorid-Lösung (5 ml/l):

200 g/l $^{15}NH_4Cl$ in H_2O , steril filtriert

anschließend steril filtriert.

Endkonzentrationen im NMM:

7 g/l Glucose

1 g/l $^{15}NH_4Cl$

2.5.3 Voll-Medium

- Luria-Bertani (LB)-Medium:

10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, in H₂O,
mit 5 mM NaOH auf pH 7.0 eingestellt und autoklaviert

2.6 Enzyme

Alkalische Phosphatase

Roche, Mannheim

DNase I

Roche, Mannheim

Lysozym

Sigma, Deisenhofen

2.7 Standard

Proteinstandard

SDS7 (66/45/36/29/24/20.1/14.2 kDa) Sigma, Deisenhofen

2.8 Verbrauchsmaterial und Zubehör

Bradford-Reagenz

Biorad, München; Pierce, Illinois, USA

Microcon Ultrafiltrationseinheiten

Millipore, Hamburg

NMR-Probenröhrchen:

5 mm

Norell Inc., Landisvill, USA

8 mm

Shigemi Co. LTD, Tokyo, Japan

Quarzglasküvetten

Perkin Elmer, Massachusetts, USA

Vivaspin Ultrafiltrationseinheiten

Vivascience, USA; Millipore, Hamburg

2.9 Verwendete Chromatographiesäulen

| | |
|------------------------------|-----------------------------------|
| Nucleosil 100 C-18 Vorfilter | Bischoff Chromatography, Leonberg |
| ODS Hypersil C18 | Beckman Coulter, Fullerton, USA |
| DEAE-Sepharose 500 ml | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| 26/10 Q-Sepharose Fast Flow | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| Sephadex G25 in PD10 | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| 16/60 Superdex 75 prep grade | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| 26/60 Superdex 75 prep grade | Amersham Pharmacia, Freiburg |

2.10 Geräte

| | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| Fluoreszenzspektrometer: LS 50 B | Perkin Elmer, Massachusetts, USA |
| FPLC-Anlage: GradiFrac-System | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| Gelelektrophoresekammern | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| HPLC-Anlage: System Gold 166 | Beckman, Unterschleißheim |
| Milliporeanlage: Milli-Q | Millipore, Hamburg |
| NMR-Spektrometer: | |
| AVANCE 300 | Bruker, Karlsruhe |
| AVANCE 500 | Bruker, Karlsruhe |
| AVANCE 600 | Bruker, Karlsruhe |
| AVANCE 800 | Bruker, Karlsruhe |
| Ultraschallgerät: Sonifier J-17A | Branson, Schwäbisch Gmünd |
| Spektrophotometer: DU 640 | Beckman, Unterschleißheim |

2.11 Auswertungs- und Darstellungssoftware

| | |
|-----------------------|--|
| Auremol 2.2 | www.auremol.de |
| CNS 1.1 | Brunger <i>et al.</i> 1998 |
| CorelDraw 9 | Corel Corporation, Ottawa, Kanada |
| Exnmr | Guido Steiner, Universität Regensburg |
| FL WinLab 2.0 | Perkin Elmer, Massachusetts, USA |
| HADDOCK 1.3 | Dominguez <i>et al.</i> 2003 |
| Molmol | http://hugin.ethz.ch/wuthrich/ software/molmol/index.html |
| Origin 6.0 | Microcal Software Inc., Massachusetts, USA |
| Topspin 1.3 | Bruker, Karlsruhe |
| WebLab ViewerLite 4.0 | Accelrys Inc., San Diego, USA |
| Win 1D | Bruker, Karlsruhe |
| X-Win NMR | Bruker, Karlsruhe |
| X-Win Plot | Bruker, Karlsruhe |

3 Methoden und Synthesen

3.1 Expression und Reinigung von Proteinen

3.1.1 Expression und Reinigung von unmarkiertem Ras

Die Überexpression von humanem H-Ras(wt) und dessen Mutanten Ras(T35A) und Ras(G12V) wurde nach der Methode nach Tucker *et al.* (1986) mit Hilfe von pTac-Vektoren im *E. coli* Stamm CK600K durchgeführt. Dazu wurden jeweils 10 Liter LB-Medium (siehe Kapitel 2.5) mit den Antibiotika Ampicillin (100 mg/l) und Kanamycin (25 mg/l) mit 160 ml einer Übernachtskultur beimpft und auf vier Erlenmeyerkolben verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und einer Schüttlergeschwindigkeit von 180 rpm. Bei einer OD₆₀₀ von 0.6 - 0.8 wurde mit 1 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Nach 15 - 18-stündiger Inkubation wurde die Kultur zentrifugiert und der Bakterienrückstand in 160 ml Aufnahmepuffer (siehe Kapitel 2.2) resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei -20°C eingefroren und gelagert.

Der Zellaufschluss wurde durch Zugabe von ca. 300 mg Lysozym zur aufgetauten Bakteriensuspension eingeleitet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C wurden 7 ml einer 6%igen Natrium-Deoxycholat-Lösung zur Zellsuspension gegeben. Nach weiteren 30 min wurden 4 mg DNase1 in 1 ml wässriger 1 M MgCl₂-Lösung zugegeben und der Ansatz nochmals 30 min bei 4°C gerührt. Zum vollständigen Aufschließen der Zellen wurde die Suspension im Eisbad noch 10 mal je 2 sek lang mit Ultraschall behandelt und 60 min bei 18000 g zentrifugiert, um die Zellfragmente zu sedimentieren.

Der klare Überstand wurde auf eine mit C/2-Puffer (siehe Kapitel 2.2) äquilibrierte DEAE-Sepharose Säule (siehe Kapitel 2.9) aufgetragen, die anschließend mit 1.5 Säulenvolumen C/2-Puffer gewaschen wurde. Die Trennung der Proteine erfolgte mit Hilfe eines linearen Salzgradienten von 0 - 300 mM NaCl in C/2-Puffer über ein Volumen von 4 Litern. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.2.2) analysiert und die Ras-Protein enthaltenden Fraktionen vereinigt. Diese

wurden mit Hilfe eines MWCO 10000 Membranfilters in einem Amicon 180 ml Konzentrator bei 4°C bis auf ca. 8 ml eingengt.

Die Proteinlösung wurde über eine mit Puffer D (siehe Kapitel 2.2) äquilibrierte 26/60 Superdex 75-Gelfiltrationssäule (siehe Kapitel 2.9) bei 4°C weiter gereinigt. Durch UV-Absorption bei 280 nm und durch SDS-PAGE wurden die Fraktionen mit reinem Ras identifiziert. Diese Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration bis zu einer Proteinkonzentration von 2 - 4 mM eingengt. Die Konzentration der Proteinlösung wurde mit Hilfe einer HPLC-Anlage wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben bestimmt. Die Lösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die maximalen Proteinausbeuten betrugen 37 mg/l Medium für Ras(wt), 45 mg/l Medium für Ras(T35A) und 7.7 mg/l Medium für Ras(G12V).

3.1.2 Expression und Reinigung von ¹⁵N-markiertem Ras(wt)

Für die Überexpression von ¹⁵N-markiertem H-Ras(wt)(1-166) wurde die Methode nach Tucker *et al.* (1986) variiert. Die Expression wurde mit Hilfe von T7-Vektoren im *E. coli* Stamm BL21(DE3) durchgeführt. 4 Liter Neidhardt-Medium (siehe Kapitel 2.5) mit 50 mg/l Carbenicilin wurden mit 100 ml einer Übernachtskultur beimpft und auf zwei Erlenmeyerkolben verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und einer Schüttlergeschwindigkeit von 220 rpm. Nach 6 h wurde bei einer OD₆₀₀ von 0.7 mit 0.2 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Nach 16-stündiger Inkubation bei 30°C und 180 rpm wurde die Zellkultur zentrifugiert, der Bakterienrückstand in 60 ml Aufnahmepuffer suspendiert und bei -20°C eingefroren und gelagert.

Der Zellaufschluss wurde durch Zugabe von ca. 100 mg Lysozym zur aufgetauten Bakteriensuspension eingeleitet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C wurden 3 ml einer 6%igen Natrium-Deoxycholat-Lösung zur Zellsuspension gegeben. Nach weiteren 30 min wurde 1 mg DNase1 in 1 ml wässriger 1 M MgCl₂-Lösung zugegeben und der Ansatz nochmals 30 min bei 4°C gerührt. Zum vollständigen Aufschließen der Zellen wurde die Suspension im Eisbad noch 10 mal je 2 sek lang mit Ultraschall behandelt und 60 min bei 18000 g zentrifugiert, um die Zellfragmente zu sedimentieren.

Der klare Überstand wurde auf eine mit C/2-Puffer äquilibrierte 26/10 Q-Sepharose-Säule (siehe Kapitel 2.9) aufgetragen, die anschließend mit 1.5 Säulenvolumen C/2-Puffer gewaschen wurde. Die Trennung der Proteine erfolgte mit Hilfe eines linearen Salzgradienten von 0 - 300 mM NaCl in C/2-Puffer über 10 Säulenvolumen. Die Fraktionen wurden durch UV-Absorption bei 280 nm und durch SDS-PAGE analysiert und die Ras-Protein enthaltenden Fraktionen vereinigt. Diese wurden mit Hilfe eines MWCO 10000 Konzentrators bei 4°C bis auf ca. 1.5 ml eingengt.

Die Proteinlösung wurde über eine mit Puffer D äquilibrierte 16/60 Superdex 75-Gelfiltrationssäule (siehe Kapitel 2.9) bei 4°C weiter gereinigt. Durch SDS-PAGE wurden die Fraktionen mit reinem ^{15}N -Ras(wt)·GDP identifiziert. Diese Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration bis zu einer Proteinkonzentration von 875 μM eingengt. Die Konzentration der Proteinlösung wurde mit Hilfe einer HPLC-Anlage bestimmt. Die Lösung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die Proteinausbeute betrug 10 mg/l Medium.

3.1.3 Expression und Reinigung von ^{15}N -markiertem Ras(T35A)

Die Isotopenmarkierung von Ras(T35A)(1-166) mit ^{15}N erfolgte wie auch in Kapitel 3.1.2 nach einer variierten Methode nach Tucker *et al.* (1986). Das Protein wurde mit Hilfe von T7-Vektoren im *E. coli* Stamm BL21(DE3) exprimiert. Dazu wurden 3.7 Liter New Minimal Medium (siehe Kapitel 2.5) mit 50 mg/l Carbenicillin versetzt und mit 300 ml einer Übernachtskultur beimpft und auf drei 5 l Erlenmeyerkolben verteilt. Die Inkubation erfolgte bei 32°C und einer Schüttlergeschwindigkeit von 180 rpm. Bei einer OD_{600} von 0.8, die nach 4-stündiger Inkubation erreicht wurde, wurde mit 0.4 mM IPTG die Proteinexpression induziert. Nach 19-stündiger Inkubation bei 32°C wurde die Zellkultur zentrifugiert und der Bakterienrückstand in 60 ml Aufnahmepuffer resuspendiert, um anschließend bei -20°C eingefroren und gelagert zu werden.

Der Zellaufschluss wurde durch Zugabe von ca. 100 mg Lysozym zur aufgetauten Bakteriensuspension eingeleitet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C wurden 2.5 ml einer 6%igen Natrium-Deoxycholat-Lösung zur Zellsuspension gegeben.

30 min später wurden 1 mg DNase1 in 1 ml wässriger 1 M MgCl_2 -Lösung zugegeben und der Ansatz nochmals 30 min bei 4°C gerührt. Um den Zellaufschluss zu vervollständigen wurde die Suspension im Eisbad noch 10 mal je 2 sek lang mit Ultraschall behandelt und anschließend 60 min lang bei 18000 g zentrifugiert, um die Zellfragmente zu sedimentieren.

Der klare Überstand wurde auf eine mit C/2-Puffer äquilibrierte 26/10 Q-Sepharose-Säule aufgetragen, die nach dem Auftragen der Proteinlösung mit 1.5 Säulenvolumen C/2-Puffer gewaschen wurde. Die Trennung der Proteine erfolgte mit Hilfe eines linearen Salzgradienten von 0 - 300 mM NaCl in C/2-Puffer über 10 Säulenvolumen. Die Fraktionen wurden durch UV-Absorption bei 280 nm und durch SDS-PAGE analysiert und die Ras-Protein enthaltenden Fraktionen vereinigt. Diese wurden mit Hilfe eines MWCO 10000 Konzentrators bei 4°C bis auf ca. 2 ml eingeengt.

Die Proteinlösung wurde über eine mit Puffer D äquilibrierte 16/60 Superdex 75-Gelfiltrationssäule bei 4°C weiter gereinigt. Durch SDS-PAGE wurden die Fraktionen mit reinem ^{15}N -Ras(T35A)-GDP identifiziert. Diese Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration bis zu einer Proteinkonzentration von 2.5 mM eingeengt. Die Konzentration der Proteinlösung wurde mit Hilfe einer HPLC-Anlage bestimmt. Die Lösung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die Proteinausbeute betrug 17 mg/l Medium.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels HPLC

Die Proteinkonzentration in Proben wurde mit Hilfe von Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (Beckman, System Gold 166) und einer ODS-Hypersil C18 Umkehrphasensäule (siehe Kapitel 2.9) bestimmt. Bei Guaninnukleotid-bindenden Proteinen, kann, wegen der 1:1 Stöchiometrie des Protein-Nukleotid-Komplexes, durch die Bestimmung der Nukleotidkonzentration ebenfalls die Konzentration des Proteins ermittelt werden. Dazu muss jedoch zunächst das ungebundene Nukleotid vollständig abgetrennt werden.

Die Absorption des durch den HPLC-Laufpuffer (siehe Kapitel 2.2) freigesetzten Nukleotids wurde bei einer Wellenlänge (λ) von 254 nm bestimmt. Die Konzentration an Acetonitril im Laufpuffer lag zwischen 3% und 7.5% bei der Auftrennung von Guaninnukleotiden und 25% zur Auftrennung der hydrophoberen mant-Guaninnukleotide. Zur Konzentrationsbestimmung der Proben wurde das HPLC-System mit einer Reihe von GDP-Lösungen geeicht, deren genaue Konzentrationen durch Messung der Absorption bei $\lambda = 254$ nm und dem Extinktionskoeffizienten $\lambda_{254}(\text{GDP}) = 13700 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ bestimmt wurden. Bei der Konzentrationsbestimmung von mant-Guaninnukleotiden wurde mit einem Extinktionskoeffizienten $\lambda_{254}(\text{mGDP}) = 22600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ gerechnet.

3.2.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Überprüfung der Reinheit von Proteinproben wurde die denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach U.K. Laemmli (1970) angewandt. Die Acrylamidkonzentration betrug dabei im Trenngel 15% und im Sammelgel 4%. Der Laufpuffer setzte sich aus 25 mM Tris-Base/ 200 mM Glycin/ 0.1% (w/v) SDS zusammen. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit 4x SDS-Probenpuffer (120 mM Tris/HCl pH 6.8; 2% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 0.01% (w/v) Bromphenolblau; 10 mM DTE) vermischt und vor dem Auftragen auf das Gel durch Hitze denaturiert (5 min bei 95 °C). Die Gele

(6 x 9 cm) wurden bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel über eine Dauer von ca. 40 min gefahren. Die Gele wurden jeweils unter Erwärmung in einer Mikrowelle zunächst in der Färbelösung (0.1% Coomassie Brilliantblau G250; 0.1% Coomassie Brilliantblau R250; 40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure) etwa 5 min gefärbt und anschließend 3 bis 5 mal in der Entfärbelösung (20% (v/v) Essigsäure; 10% (v/v) Ethanol) bis zum deutlichen Sichtbarwerden der Proteinbanden entfärbt. Als Größenstandard wurde der Proteinstandard SDS7 (siehe Kapitel 2.7) verwendet.

3.2.3 Nukleotidaustausch

3.2.3.1 Nukleotidaustausch zu GTP

Der Austausch von Ras·GDP zu Ras·GTP wurde in Anwesenheit von 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 10 mM EDTA durchgeführt, um die Dissoziationsrate des Nukleotids zu erhöhen. Mit einem 50-fachen Überschuss an GTP und einer Inkubationszeit von 4 h bei 4°C, konnte so Ras(T35A) mit einer GTP-Beladung von bis zu 85% erhalten werden. Nach der Abtrennung des freien Nukleotids durch Gelfiltration an einer 16/60 Superdex 75 Gelfiltrationssäule konnte Ras(T35A) mit GTP-Beladungen von 85% im Messpuffer A (siehe Kapitel 2.2) erhalten werden.

3.2.3.2 Nukleotidaustausch zu GppNHp oder mGppNHp

Der Austausch von GDP zu den stabilen GTP-Analoga wurde mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase durchgeführt. Zu einer 250 - 600 mM Ras·GDP-Lösung in Puffer ohne Mg^{2+} (siehe Kapitel 2.2) wurden 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und eine Spur ZnCl_2 gegeben. Zudem wurde ein 2.5-facher Überschuss des gewünschten GTP-Analogs und alkalische Phosphatase (2 U/mg Protein) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde das Protein durch Gelfiltration im gewünschten Puffer an einer 16/60 Superdex 75 Gelfiltrationssäule oder einer PD10 Sephadex G25 Gelfiltrationssäule (siehe Kapitel 2.9) gereinigt.

3.3 Messmethoden

3.3.1 Kernspinresonanz-Spektroskopie

3.3.1.1 Temperatureichung und Referenzierung

Die reale Temperatur der NMR-Proben wurde extern mit Hilfe einer Ethylenglykol-Probe für jeden verwendeten Probenkopf nach der Methode von Raiford *et al.* (1979) kalibriert. Dabei wurde die Temperatur T über den Abstand $\Delta\delta$ der Signale der Methylen- und der Hydroxylgruppe mittels Gleichung 3.1 berechnet:

$$T = 465.77K - 100.06K \cdot \Delta\delta - 0.6276K \cdot \Delta\delta^2 \quad (3.1)$$

Die reale Temperatur konnte durch lineare Regression der eingestellten Temperatur gegen die berechneten Temperaturen ermittelt werden.

Die Referenzierung der ^{15}N - und der ^{31}P -NMR-Spektren wurde indirekt über das DSS Signal durchgeführt, wie in Maurer & Kalbitzer (1996) beschrieben. Dazu wurde vor jeder NMR-Messung ein ^1H -Spektrum aufgenommen. Bei ^{31}P -NMR-Spektren wurde ein Ξ -Wert von 0.4048073561 (Maurer & Kalbitzer 1996) eingesetzt, der externer 85%iger Phosphorsäure in Glaskügelchen entspricht. Bei ^{15}N -NMR-Spektren wurde ein Ξ -Wert von 0.101329118 (Wishart *et al.* 1995) verwendet, der externem Ammoniak in einer Kapillare entspricht.

3.3.1.2 Messung von 2D-NMR Spektren

3.3.1.2.A ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren am AVANCE 600

^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren wurden mit Hilfe einer HSQC-Pulssequenz (*hsqcetf3gpsi* Palmer *et al.* 1991, Shaka *et al.* 1985, Kay *et al.* 1992, Schleucher *et al.* 1994) an einem Bruker AVANCE 600 NMR-Spektrometer aufgenommen. Die Pulssequenz beinhaltet eine ^1H - ^{15}N -Korrelation mittels eines doppelten *INEPT*-Transfers, eine Empfindlichkeitssteigerung, eine Protonenentkopplung während der Daten-

aufnahme mittels einer GARP-Gradientensequenz und eine Wasserunterdrückung mittels TPPI-Gradientenselektion.

Die Protonen-Resonanzfrequenz betrug dabei 600.13 MHz, die ^{15}N -Resonanzfrequenz von 60.81 MHz. Die Messungen wurden in Messpuffer B in Anwesenheit von 5% D_2O und 0.2 mM DSS mit Hilfe eines 5 mm TXI-Cryoprobekopfs in 5 mm Probenröhrchen bei 293K durchgeführt. Das Volumen der Proben betrug 0.5 ml bei einer Proteinkonzentration von 1.3 mM. Die Pulslängen wurde entsprechend der 90° Pulse, die ^1H - ^{15}N -Kopplungskonstante wurde auf 92 Hz und die D_1 -Zeit auf 1.5 s eingestellt. Jedes 2D-Spektrum wurde als komplexe Datenmatrix von 256×2048 Punkten mit 16 *Scans* pro *Increment* aufgenommen. Die Spektrenweiten betrugen 8389 Hz mit einem Trägerfrequenz-Offset von 2819.5 Hz in der ^1H -Dimension und 2433 Hz mit einem Trägerfrequenz-Offset von 7200 Hz in der ^{15}N -Dimension. Die digitale Auflösung der Spektren lag bei 2.1 Hz/Datenpunkt (^1H -Dimension) bzw. 4.8 Hz/Datenpunkt (^{15}N -Dimension).

3.3.1.2.B ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren am AVANCE 600

^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren wurden mit Hilfe einer TROSY-Pulssequenz (*trocyf3gppsi19* Czisch & Boelens 1998, Pervushin *et al.* 1998, Meissner *et al.* 1998, J. Weigelt 1998, Rance *et al.* 1999, Zhu *et al.* 1999) an einem Bruker AVANCE 600 NMR-Spektrometer aufgenommen. Die Pulssequenz beinhaltet eine empfindlichkeitssteigernde Gradientensequenz und eine *Watergate*-Wasserunterdrückung.

Die Protonen-Resonanzfrequenz betrug dabei 600.13 MHz, die ^{15}N -Resonanzfrequenz 60.81 MHz. Die Messungen wurden in Messpuffer B in Anwesenheit von 5% D_2O und 0.2 mM DSS mit Hilfe eines 5 mm TXI-Cryoprobekopfs in 5 mm Probenröhrchen bei 293K durchgeführt. Das Volumen der Proben betrug 0.5 ml bei einer Proteinkonzentration von 0.9 mM. Die Pulslängen wurden entsprechend der 90° Pulse, die ^1H - ^{15}N -Kopplungskonstante wurde auf 92 Hz und die D_1 -Zeit auf 2 s eingestellt. Jedes 2D-Spektrum wurde als komplexe Datenmatrix von 256×2048 Punkten mit 16 *Scans* pro *Increment* aufgenommen. Die Spektrenweiten betrugen 8389 Hz mit einem Trägerfrequenz-Offset von 2815.5 Hz in der ^1H -Dimension und 2433 Hz mit einem Trägerfrequenz-Offset von

7199.98 Hz in der ^{15}N -Dimension. Die digitale Auflösung der Spektren lag bei 2.1 Hz/Datenpunkt (^1H -Dimension) bzw. 2.4 Hz/Datenpunkt (^{15}N -Dimension).

3.3.1.2.C ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren am AVANCE 800

^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren wurden mit Hilfe einer TROSY-Pulssequenz, wie unter Kapitel 3.3.1.2B beschrieben, an einem Bruker AVANCE 800 NMR-Spektrometer aufgenommen. Die Protonen-Resonanzfrequenz betrug dabei 800.2 MHz, die ^{15}N -Resonanzfrequenz 81.08 MHz. Die Messungen wurden in Messpuffer B in Anwesenheit von 5% D_2O und 0.2 mM DSS mit Hilfe eines 5 mm TCI-Cryoprobekopfs in 5 mm Probenröhrchen bei 293K durchgeführt. Das Volumen der Proben betrug 0.5 ml bei einer Proteinkonzentration von 0.84 mM. Die Pulslängen wurden entsprechend der 90° Pulse, die ^1H - ^{15}N -Kopplungskonstante wurde auf 92 Hz und die D_1 -Zeit auf 2 s eingestellt. Jedes 2D-Spektrum wurde als komplexe Datenmatrix von 256 x 2048 Punkten mit 32 *Scans* pro *Increment* aufgenommen. Die Spektrenweiten betrugen 11160.7 Hz mit einem Trägerfrequenz-Offset von 3760 Hz in der ^1H -Dimension und 3244 Hz mit einem Trägerfrequenz-Offset von 9600 Hz in der ^{15}N -Dimension. Die digitale Auflösung der Spektren lag bei 2.7 Hz/Datenpunkt (^1H -Dimension) bzw. 3.2 Hz/Datenpunkt (^{15}N -Dimension).

3.3.1.3 NMR-Spektren zur Zuordnung der synthetisierten Moleküle

3.3.1.3.A Allgemeines

Die NMR-Spektren zur Charakterisierung der synthetisierten Moleküle wurden hauptsächlich in d_6 -DMSO aufgenommen. Die Referenzierung erfolgte extern auf das Lösungsmittelsignal bei 2.50 ppm für die ^1H -Dimension und 39.52 ppm für ^{13}C -Dimension (Gottlieb *et al.* 1997).

3.3.1.3.B Messungen am AVANCE 300 (Zentrale Analytik in der NWF IV)

^1H -NMR-Spektren zur Standardcharakterisierung wurden mit Hilfe einer 1D-Pulssequenz mit einem 30° Anregungspuls (*zg30*) an einem Bruker AVANCE 300 NMR-Spektrometer bei einer Protonenresonanzfrequenz von 300.13 MHz aufgenommen. Die Messungen wurden mit Hilfe eines 5 mm DUL-Probenkopfs in 5 mm Probenröhrchen bei 293K durchgeführt. Das Volumen der Proben betrug 0.7 ml bei variierenden Probenkonzentration von 1 - 10 mM. Die Pulslängen wurden auf 8 μs bei 2 dB und einer D_1 -Zeit von 2 s eingestellt. Die Spektrenweiten betrugen 8993 Hz bei einem Trägerfrequenz-Offset von 1500.1 Hz. Die digitale Auflösung der Spektren lag bei 0.14 Hz/Datenpunkt.

3.3.1.3.C Messungen am AVANCE 600

Alle Messungen wurden an einem Bruker AVANCE 600 NMR-Spektrometer bei einer Protonen-Resonanzfrequenz von 600.13 MHz bzw. einer ^{13}C -Resonanzfrequenz von 150.90 MHz mit Hilfe eines 5 mm TXI-Cryoprobenkopfs in 5 mm Probenröhrchen bei 298K durchgeführt. Die Probenkonzentrationen betrugen dabei ca. 10 mM in einem Probenvolumen von 0.7 ml DMSO. Alle Pulslängen wurden entsprechend den 90° Pulsen eingestellt.

DQF-COSY-Spektren wurden mit Hilfe einer DQF-COSY-Pulssequenz (*cosydfph* Derome & Williamson 1990) aufgenommen. Die Pulssequenz beinhaltet eine phasensensitive, doppelquantengefilterte Aufnahme. Die D_1 -Zeit wurde auf 2 s eingestellt. Jedes 2D-Spektrum wurde als komplexe Datenmatrix von 256 x 4096 Punkten mit 16 *Scans* pro *Increment* aufgenommen. Die Spektrenweiten betrugen je 7788 Hz mit einem Trägerfrequenz-Offset von 2826.6 Hz in beiden Dimensionen. Die digitale Auflösung der Spektren lag bei je 3.8 Hz/Datenpunkt in beiden Dimensionen.

^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren wurden mit Hilfe einer HSQC-Pulssequenz, wie in Kapitel 3.3.1.2A beschrieben, aufgenommen. Der Unterschied zwischen beiden Pulssequenzen betrifft lediglich den Kanal des zweiten Kerns: ^{13}C auf Kanal 2, ^{15}N auf Kanal 3. Die ^1H - ^{13}C -Kopplungskonstante wurde auf 145 Hz und die D_1 -Zeit auf 1.5 s eingestellt. Jedes 2D-Spektrum wurde als komplexe Datenmatrix von

256 x 4096 Punkten mit 16 Scans pro *Increment* aufgenommen. Die Spektrenweiten betrugen 8013 Hz mit einem Trägerfrequenz-Offset von 2826.6 Hz in der ^1H -Dimension und 25000 Hz mit einem Trägerfrequenz-Offset von 12072.22 Hz in der ^{13}C -Dimension. Die digitale Auflösung der Spektren lag bei 3.9 Hz/Datenpunkt (^1H -Dimension) bzw. 12.2 Hz/Datenpunkt (^{13}C -Dimension).

^1H - ^{13}C -HMBC-Spektren wurden mit Hilfe einer HMBC-Pulssequenz (*hmbcgplpndqf*) aufgenommen. Die Pulssequenz beinhaltet eine ^1H - ^{13}C -Korrelation mittels einer heteronuklearen Einfach- und Doppelquanten-Kohärenz, einen *low-pass J*-Filter zur Unterdrückung der direkten ^1H - ^{13}C -Kopplung und eine Gradientenselektion. Der Filter wurde auf eine ^1H - ^{13}C -Kopplungskonstante von 145 Hz, die *long range* ^1H - ^{13}C -Kopplungskonstante auf 10 Hz und die D_1 -Zeit auf 2 s eingestellt. Jedes 2D-Spektrum wurde als komplexe Datenmatrix von 256 x 4096 Punkten mit 16 Scans pro *Increment* aufgenommen. Die Spektrenweiten betrugen 7788 Hz mit einem Trägerfrequenz-Offset von 2826.6 Hz in der ^1H -Dimension und 24147 Hz mit einem Trägerfrequenz-Offset von 12072.22 Hz in der ^{13}C -Dimension. Die digitale Auflösung der Spektren lag bei 3.8 Hz/Datenpunkt (^1H -Dimension) bzw. 11.8 Hz/Datenpunkt (^{13}C -Dimension).

3.3.1.3.D Messungen am AVANCE 800

^{13}C -NMR-Spektren wurden mit Hilfe einer 1D-Pulssequenz mit einem 30° Anregungspuls und Protonenentkopplung (*zgpg30*) an einem Bruker AVANCE 800 NMR-Spektrometer bei einer ^{13}C -Resonanzfrequenz von 201.21 MHz aufgenommen. Die Protonen wurden mittels einer Waltz16-Entkopplungssequenz während der D_1 -Zeit entkoppelt. Die Messungen wurden in DMSO mit Hilfe eines 5 mm TCI-Cryoprobekopfs in 5 mm Probenröhrchen bei 298K durchgeführt. Das Volumen der Proben betrug 0.7 ml bei einer Probenkonzentration von ca. 10 mM. Die Pulslängen wurde entsprechend der 90° Pulse, die D_1 -Zeit auf 5 s und die D_E -Zeit auf 12 μs eingestellt. Die Spektrenweiten betrugen 48077 Hz mit einem Trägerfrequenz-Offset von 24145 Hz. Die digitale Auflösung der Spektren lag bei 0.7 Hz/Datenpunkt.

3.3.1.4 Aufnahme von *WaterLOGSY*-Spektren

WaterLOGSY-Spektren wurden mit Hilfe einer von Dalvit *et al.* (2000) entwickelten *ePHOGSY-NOE* Pulssequenz hauptsächlich an einem Bruker AVANCE 500 NMR-Spektrometer bei einer Protonenresonanzfrequenz von 500.13 MHz aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe eines 180° *Shape*-pulses, eingestrahlt auf die Resonanzfrequenz des Wassersignals. Die Messungen wurden in Messpuffer C in Anwesenheit von 5% D₂O und 0.2 mM DSS mit Hilfe eines 5 mm TXI-Probenkopfs in 5 mm Probenröhrchen bei 298K durchgeführt. Das Volumen der Proben betrug 0.5 ml bei Proteinkonzentrationen von 20 - 50 µM und Substanzkonzentrationen von 1.0 - 5.0 mM. Die Pulslängen wurden entsprechend eines 90° Pulses bei einer D₁-Zeit von 2 s eingestellt. Die digitale Auflösung der Spektren war dabei immer besser als 0.3 Hz/Datenpunkt.

3.3.1.5 Messung von ³¹P-NMR-Spektren

³¹P-NMR-Spektren wurden mit Hilfe einer 1D-Pulssequenz mit Protonen-entkopplung (*zgig*) an einem Bruker AVANCE 500 NMR-Spektrometer bei einer ³¹P-Resonanzfrequenz von 202.456 MHz aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe einer Protonenentkopplung durch eine GARP-Sequenz (Shaka *et al.*, 1985) während der Datenaufnahme. Die Messungen wurden überwiegend in Messpuffer A in Anwesenheit von 5% D₂O und 0.2 mM DSS mit Hilfe eines 10 mm ³¹P-Probenkopfs in 8 mm Shigemi-Probenröhrchen bei 278K durchgeführt. Das Volumen der Proben betrug zwischen 0.5 und 0.8 ml bei Proteinkonzentrationen von 1.0 - 1.3 mM. Die Pulslänge wurde entsprechend eines 70° Pulses eingestellt, um die D₁-Zeit auf 5 s reduzieren zu können. Die digitale Auflösung der Spektren war dabei immer besser als 0.4 Hz/Datenpunkt.

3.3.1.6 Messung der ^{31}P -NMR-Spektren zur Bestimmung der T_1 -Relaxationszeit der Nukleotidphosphate

^{31}P -NMR-Spektren wurden, wie unter Kapitel 3.3.1.4 beschrieben, an einem Bruker AVANCE 500 NMR-Spektrometer unter gleichen Bedingungen als pseudo-2D *inversion recovery* Spektren mit variierenden Wartezeiten τ zwischen dem 180° und dem 90° Puls in einer 1D-Pulssequenz (*t1ir*), aufgenommen. Die Protonen-Entkopplung erfolgte wie unter Kapitel 3.3.1.4 beschrieben. Das Probenvolumen betrug 550 μl einer 1.3 mM Ras(T35A)·GppNHp Lösung in Messpuffer A in Anwesenheit von 5% D_2O und 0.2 mM DSS. Der 90° Puls wurde mit Hilfe einer 20 mM KPi -Probe in 40 mM HEPES-Puffer bei pH 7.4 und die D_1 -Zeit auf 15 s eingestellt. Die Spektrenweiten betrugen 5252 Hz mit einem Trägerfrequenz-Offset von -1191.45 Hz. Die digitale Auflösung der Spektren betrug dabei 0.64 Hz/Datenpunkt.

3.3.2 Fluoreszenzspektroskopie

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten von Cyclenderivaten zu Ras-mant-Nukleotid-Komplexen wurden Fluoreszenzmessungen bei einer Temperatur von 25°C und einem pH-Wert von 7.5 in Messpuffer D durchgeführt. Ras·mGXP wurde dazu mit einer Konzentration von 0.5 - 1.0 μM in 3 ml Messpuffer D vorgelegt und die zu untersuchenden Cyclenderivate hinzu titriert. Das Nukleotid wurde bei 366 nm angeregt (John *et al.* 1990) und zu jeder Titrationsstufe ein Emissionsspektrum zwischen 380 nm und 600 nm mit 220 nm/min und Schlitzbreiten von 10 nm (Extinktion) und 5 nm (Emission) aufgenommen. Die Flächen der Spektren wurden mittels des Programms FL WinLab 2.0 ermittelt und mit dem Emissionsspektrum des reinen Puffers korrigiert.

3.4 Auswertung der NMR- und Fluoreszenz-Daten

3.4.1 Bestimmung der Parameter von ^{31}P -Resonanzlinien

Zur Auswertung der experimentellen Relaxationsdaten wurden die ^{31}P -NMR-Spektren in X-Win NMR prozessiert, exportiert und mit dem Programm *Exnmr* (G. Steiner, Regensburg) in ein *ascii*-Format umgewandelt. Mit Hilfe des Programms Origin 6.0 (siehe Kapitel 2.11) wurden modifizierte Lorentzlinien (siehe Gleichung 3.3) den experimentellen Resonanzlinien der ^{31}P -Kerne des Nukleotids angepasst. Dabei wurde eine Lorentzfunktion auf drei Linien erweitert, die zusätzlich, aufgrund der jeweiligen Aufspaltung durch die Spin-Spin-Kopplung mit den Nachbarkernen, modifiziert wurden. Die Kopplungskonstanten J_1 ($= {}^2J_{\alpha\beta}$) und J_2 ($= {}^2J_{\beta\gamma}$) wurden den Phosphorkopplungen des freien GppNHp-Nukleotids gleich gesetzt, wobei keine weitere Aufspaltung der Linien durch die dritte Kopplung (${}^4J_{\alpha\gamma} = 0$) eingeführt wird (Spoerner *et al.* 2005B). Diese Modifikation führt zu den gewünschten Aufspaltungen der Nukleotidphosphate in ein Doppeldublett für den β -Phosphor und in zwei Dubletts für den α - bzw. den γ -Phosphor.

$$\begin{aligned}
 y = y_0 + \frac{A_1}{\pi} & \left[\frac{\omega_1 + \omega_{\text{lb}}}{4((x - xc_1 + \frac{J_1}{2})^2 + (\omega_1 + \omega_{\text{lb}})^2)} + \frac{\omega_1 + \omega_{\text{lb}}}{4((x - xc_1 - \frac{J_1}{2})^2 + (\omega_1 + \omega_{\text{lb}})^2)} \right] + \\
 + \frac{A_2}{\pi} & \left[\frac{\omega_2 + \omega_{\text{lb}}}{4((x - xc_2 + \frac{J_2}{2})^2 + (\omega_2 + \omega_{\text{lb}})^2)} + \frac{\omega_2 + \omega_{\text{lb}}}{4((x - xc_2 - \frac{J_2}{2})^2 + (\omega_2 + \omega_{\text{lb}})^2)} \right] + \\
 + \frac{A_3}{2\pi} & \left[\frac{\omega_3 + \omega_{\text{lb}}}{4((x - xc_3 + \frac{J_1}{2} + \frac{J_2}{2})^2 + (\omega_3 + \omega_{\text{lb}})^2)} + \frac{\omega_3 + \omega_{\text{lb}}}{4((x - xc_3 + \frac{J_1}{2} - \frac{J_2}{2})^2 + (\omega_3 + \omega_{\text{lb}})^2)} + \right. \\
 + \frac{\omega_3 + \omega_{\text{lb}}}{4((x - xc_3 - \frac{J_1}{2} + \frac{J_2}{2})^2 + (\omega_3 + \omega_{\text{lb}})^2)} & \left. + \frac{\omega_3 + \omega_{\text{lb}}}{4((x - xc_3 - \frac{J_1}{2} - \frac{J_2}{2})^2 + (\omega_3 + \omega_{\text{lb}})^2)} \right] \quad (3.2)
 \end{aligned}$$

Die übrigen Parameter, die in Gleichung 3.2 verwendet werden, modellieren die Basislinienkorrektur (y_0), die Linienverbreiterung der prozessierten Spektren (ω_{lb}) und die chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale (xc_1 , xc_2 und xc_3) mit den Flächen A_1 , A_2 und A_3 und für die Linienbreiten (ω_1 , ω_2 und ω_3).

3.4.2 Simulation der T_1 -Relaxationszeiten

Die longitudinalen Relaxationszeiten T_1 der einzelnen ^{31}P -Kerne konnten aus den jeweiligen z-Magnetisierungen $M_z(t)$ (= Signalfäche A zur Zeit t) und den Magnetisierungen im thermischen Gleichgewicht M_0 mit Hilfe der Gleichung **3.3** bestimmt werden.

$$M_z(t) = M_0 - [M_0 - M_z(0)]e^{-\frac{t}{T_1}} \quad (3.3)$$

Wenn Liganden an das Nukleotid binden, beeinflussen diese die Relaxationszeiten der Phosphorkerne, insbesondere wenn diese Liganden paramagnetische Metallionen enthalten. Die resultierenden longitudinalen Relaxationszeiten T_{1c} der Nukleotidphosphate für gebundene Liganden können aus den Relaxationszeiten der Phosphate des freien Ras-Nukleotid-Komplexes T_{1f} und den bestimmten Relaxationszeiten T_1 der einzelnen Titrationsschritte angepasst werden. Ausgehend von den Bedingungen für einen schnellen Austausch und einer 1:1 Bindung können die jeweiligen Relaxationsraten R_1 (= $1/T_1$) mittels Gleichung **3.4** beschrieben werden.

$$R_1 = \frac{c_p}{c_p^0} R_{1f} + \frac{c_{pl}}{c_p^0} R_{1c} \quad (3.4)$$

In diese Gleichung gehen neben den Relaxationsraten R_{1f} (wenn kein Ligand an das Nukleotid gebunden ist) und R_{1c} (wenn das Nukleotid vollständig mit Liganden gesättigt ist) auch die Konzentrationen für das freie Protein c_p und für den gesättigten Ligand-Ras-Nukleotid-Komplex c_{pl} ein. c_p^0 bzw. c_l^0 stehen dabei für die totalen Konzentrationen an Protein-Nukleotid-Komplex bzw. an Liganden. Zusammen mit der Definition der Dissoziationskonstante K_D kann Gleichung **3.4** in Gleichung **3.5** und **3.6** umformuliert werden (vgl. Kachel *et al.* 2003).

$$R_1 = (R_{1c} - R_{1f}) \frac{c_p^0 + c_l^0 + K_D - \sqrt{(c_p^0 + c_l^0 + K_D)^2 - 4c_p^0 c_l^0}}{2c_p^0} + R_{1f} \quad (3.5)$$

$$T_1 = \frac{2c_p^0 T_{1f} T_{1c}}{(T_{1f} - T_{1c})(c_p^0 + c_l^0 + K_D - \sqrt{(c_p^0 + c_l^0 + K_D)^2 - 4c_p^0 c_l^0}) + 2c_p^0 T_{1c}} \quad (3.6)$$

3.4.3 Berechnung von Cu-P-Abständen

Die longitudinale (R_1) und die transversale (R_2) Relaxationsrate eines NMR-aktiven Kerns hängen beide stark von den Elektronenrelaxationsraten ab. Diese können mit Hilfe der Solomon-Bloembergen-Gleichung (3.7) beschrieben werden, wenn sich in der Umgebung des Kerns ein paramagnetisches Zentrum befindet (Arnesano *et al.* 2003).

$$R_1 = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_I^2 g_e^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r^6} \left[\frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_c^2} \right] + \frac{2}{3} S(S+1) \left(\frac{A}{\hbar} \right)^2 \frac{\tau_e}{1 + \omega_S^2 \tau_e^2} \quad (3.7)$$

Der erste Term der Gleichung 3.7 berücksichtigt den Anteil der dipolaren Wechselwirkung des paramagnetischen Elektrons mit dem Kernspin des nahen, NMR-aktiven Kerns. Dabei ist die Wechselwirkung umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands vom Elektrons zum Kern (r^6). Der zweite Term enthält den Anteil für die Fermi-Kontaktwechselwirkungen. Die übrigen Parameter stehen stellvertretend für die magnetische Permeabilität im Vakuum (μ_0), das Bohr'sche Magneton (μ_B), das gyromagnetische Verhältnis (γ_I), den freien Elektronen-g-Faktor (g_e), die Quantenzahl (S), die Elektronen-Korrelationszeit (τ_e), die effektive Korrelationszeit für Dipol-Dipol-Interaktionen (τ_c) und die Konstante für den Kopplungskontakt zwischen dem Elektronenspin und dem Kernspin (A). Im untersuchten Fall ist die Larmorfrequenz des paramagnetischen Elektrons (ω_S) viel größer als die des Phosphors (ω_I). Wie R.A. Dwek (1973) schreibt, können daher die Terme mit den Elektronenfrequenzen vernachlässigt werden. Damit kann Gleichung 3.7 auf Gleichung 3.8 reduziert werden, mit deren Hilfe der Abstand zwischen dem paramagnetischen Cu(II)-Ion und den drei Phosphorkernen berechnet werden kann.

$$R_1 = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma^2 g_e^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r^6} \left[\frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} \right] \quad (3.8)$$

3.4.4 Berechnung der Dissoziationskonstanten aus NMR-Messungen

Unter der Annahme, dass sich die chemische Verschiebung, wie in Gleichung 3.9 beschrieben, aus der Verschiebung des ungebundenen Proteins, δ_f , und dem Anteil der maximalen Änderung der chemische Verschiebung $\Delta\delta_{max}$ zusammensetzt, kann das Verhältnis der verschiedenen Dissoziationskonstanten der einzelnen Bindungsstellen errechnet werden.

$$\delta = \delta_f + \frac{c_{pl}}{c_p^0} \Delta\delta_{max} \quad (3.9)$$

Voraussetzung hierfür ist eine 1:1 Bindung an der jeweiligen Bindestelle, bei der sich das Protein und der Ligand im schnellen Austausch befinden. Dabei kann das Verhältnis aus gebundenem zu totalem Protein aus dem K_D -Wert und der Konzentration des freien Liganden (c_l) berechnet werden (siehe Gleichung 3.10).

$$\frac{c_{pl}}{c_p^0} = \frac{c_l}{K_D + c_l} \quad (3.10)$$

Die zwei oben aufgeführten Gleichungen 3.9 und 3.10 sind allgemein für jede Bindungsstelle gültig. Werden beide Gleichungen kombiniert, ergibt sich die chemische Verschiebung zu:

$$\delta = \delta_f + \frac{c_l}{K_D + c_l} \Delta\delta_{max} \quad (3.11)$$

Daraus kann die Konzentration für den freien Liganden in Abhängigkeit von der chemischen Verschiebung und der Dissoziationskonstante erhalten werden.

$$c_l = \frac{(\delta - \delta_f)K_D}{\Delta\delta_{max} - \delta + \delta_f} = \frac{\Delta\delta \cdot K_D}{\Delta\delta_{max} - \Delta\delta} \quad (3.12)$$

Wird nun Vorausgesetzt, dass die Konzentration an freiem Liganden für alle Bindungsstellen gleich groß ist, kann aus den Gleichungen 3.11 und 3.12 für die verschiedenen Bindungsstellen a und b eine Funktion zur Anpassung des

Verhältnisses der Dissoziationskonstanten K_D^b / K_D^a und der maximalen Änderung der chemischen Verschiebung an die chemischen Verschiebungen δ^a und δ^b errechnet werden.

$$\delta^b = \frac{\Delta\delta_{max}^b}{\frac{K_D^b}{K_D^a} \cdot \left(\frac{\Delta\delta_{max}^a}{\delta^a - \delta_f^a} - 1 \right) + 1} \quad (3.13)$$

Ausgehend von der Zusammensetzung der chemischen Verschiebung aus den einzelnen Verschiebungen des freien Zustands δ_f und des gebundenen Zustands δ_c , kann die Dissoziationskonstante für eine 1:1 Bindung im schnellen Austausch zudem mit Hilfe der Gleichung **3.14** bzw. **3.15** (vgl. Kachel *et al.* 2003) bestimmt werden.

$$\delta = (\delta_c - \delta_f) \frac{c_p^0 + c_l^0 + K_D - \sqrt{(c_p^0 + c_l^0 + K_D)^2 - 4c_p^0 c_l^0}}{2c_p^0} + \delta_f \quad (3.14)$$

$$\Delta\delta = \delta - \delta_f = (\delta_c - \delta_f) \frac{c_p^0 + c_l^0 + K_D - \sqrt{(c_p^0 + c_l^0 + K_D)^2 - 4c_p^0 c_l^0}}{2c_p^0} \quad (3.15)$$

Gleichung **3.12** kann mittels der Definition der einzelnen Dissoziationskonstanten auch in die folgende Form gebracht werden:

$$c_l = c_l^0 - c_p^0 \cdot \left(\sum_{i=1}^n \frac{\delta^i - \delta_f^i}{\Delta\delta_{max}^i} \right) = c_l^0 - c_p^0 \cdot \left(\sum_{i=1}^n \frac{\Delta\delta^i}{\Delta\delta_{max}^i} \right) \quad (3.16)$$

Mit deren Hilfe kann die freie Konzentration des Liganden aus den einzelnen chemischen Verschiebungen δ^i der n Bindungsstellen errechnet werden.

In einer Auftragung der Änderungen in den chemischen Verschiebungen $\Delta\delta^i$ gegen die freien Ligandenkonzentrationen können die Dissoziationskonstanten für die einzelnen Bindungsstellen i mittels der aus der Gleichung **3.11** entstehenden Gleichung **3.17** ermittelt werden.

$$\Delta\delta^i = \frac{c_l}{K_D^i + c_l} \Delta\delta_{max}^i \quad (3.17)$$

3.4.5 Bestimmung der Dissoziationskonstanten aus Fluoreszenzspektren

Bindungskonstanten können aus Fluoreszenztitrationen mittels Gleichung **3.18** durch die Auftragung der Flächenänderung ΔA gegen die jeweilige Gesamtkonzentration c_l^0 der Cyclenderivate ermittelt werden.

$$\Delta A = A - A_f = (A_c - A_f) \frac{c_p^0 + c_l^0 + K_D - \sqrt{(c_p^0 + c_l^0 + K_D)^2 - 4c_p^0 c_l^0}}{2c_p^0} \quad (3.18)$$

Die Menge des emittierten Lichts, die dem Integral (Fläche) des Emissionsspektrums entspricht, setzt sich, vergleichbar mit den Relaxationsraten (siehe Kapitel 3.4.2), aus den einzelnen Flächen A_f (des freien Ras-mGXP-Komplexes) und A_c (des vollständig mit Ligand komplexierten Proteins) gewichtet nach deren Anteilen in der Lösung zusammen. Daher kann Gleichung **3.18** in Anlehnung an Gleichung **3.5** (siehe Kapitel 3.4.2) unter der Annahme einer 1:1 Bindung im schnellen Austausch erhalten werden. Dabei werden in Gleichung **3.4** die Relaxationsraten durch die entsprechenden Flächen ersetzt und wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben weiter verfahren.

Gleiches gilt auch für die Berechnung der K_D -Werte aus den Intensitätsmaxima I . Daher lässt sich Gleichung **3.18** für diesen Fall in Gleichung **3.19** umschreiben.

$$\Delta I = I - I_f = (I_c - I_f) \frac{c_p^0 + c_l^0 + K_D - \sqrt{(c_p^0 + c_l^0 + K_D)^2 - 4c_p^0 c_l^0}}{2c_p^0} \quad (3.19)$$

3.5 Moleküldynamikrechnungen

Moleküldynamik-Rechnungen (MD-Rechnungen) wurden mit dem CNS-Skript HADDOCK (Dominguez *et al.* 2003) durchgeführt. Dieses *Docking*-Protokoll führt ein schrittweises Annähern der Moleküle in 3 Etappen durch:

1. die zufällige Anordnung der Molekülorientierungen mit anschließender Energieminimierung bei starrer Molekülstruktur (*rigid body docking*),
2. ein simuliertes Annähern der Moleküle bei gleichzeitiger Variation der Torsionswinkel (*semi flexible annealing*) und
3. eine (abschließende) Verfeinerung im Kartesischen Raum mit detailliertem *Refinement* in Wasser (*Waterrefinement*).

Die Parameter für jeden einzelnen Schritt wurden, bis auf die nachfolgenden Änderungen, vom original HADDOCK-Setup, wie es mit Hilfe der HADDOCK Homepage erstellt wurde, übernommen. Zum Berechnen der einzelnen Molekülstrukturen wurde CNS (Brunger *et al.* 1998) verwendet. Die Energien wurden dabei mittels des kompletten Satzes der elektrostatischen und der van-der-Waals-Energietерme mit einer *cutoff* Distanz von 3.9 Å ausgewertet. Die Molekülparameter wurden für dieses spezielle Ligand-Protein-*Docking* mit Hilfe von optimierten Parametern für Simulationen in wässrigen Medien (*optimized parameters for liquid simulations, OPLS*) eingestellt. Dabei wurde das parallhdg5.3.pro Kraftfeld modifiziert und der Ligand in den „torsiontop“-Dateien fixiert. Zum Start wurden in HADDOCK uneindeutige (*ambiguous interaction restraints, AIRs*) und eindeutige Abstandsinformationen eingelesen, wobei die Energiekonstanten für die Einhaltung der eindeutigen Abstände um den Faktor 10 erhöht wurden.

3.6 Organische Synthesen

3.6.1 Allgemeine Angaben

3.6.1.1 NMR-Spektroskopie

Folgender Angabemodus wird verwendet:

^1H -NMR: Chemische Verschiebung (Multiplizität, Anzahl der Protonen, Kopplungskonstante, Zuordnung).

^{13}C -NMR: Chemische Verschiebung (Spinmultiplizität, Zuordnung, Meßmethode).

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

Multiplizität: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, t = Triplett, dt = Dublett vom Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = breit.

Spinmultiplizität: (+) = primäre oder tertiäre C-Atome, (-) = sekundäre C-Atome, C_{quart} = quartäre C-Atome.

Zuordnung: o = Ortho-, m = Meta-, p = Paraposition bei aromatischen (Ar.) Verbindungen.

Die Genauigkeit der Angabe der chemischen Verschiebung beträgt 0.01 ppm (^1H -NMR) bzw. 0.01 ppm (^{13}C -NMR). Kopplungskonstanten werden mit einer Genauigkeit von 0.1 Hz angegeben.

3.6.1.2 Massenspektroskopie

Die Massenspektren wurden an einem Finnigan MAT TSQ 7000 (ESI) Massenspektrometer aufgenommen.

3.6.1.3 UV/Vis-Spektroskopie

Zur Aufnahme von UV/Vis-Spektren wurde ein Cary BIO 50 UV/Vis/NIR-Spektrophotometer der Firma Varian verwendet. Die Spektren wurden in 1 cm Quarzglasküvetten der Firma Hellma in Millipore-Wasser aufgenommen.

Folgender Angabemodus wird bei einer Genauigkeit von 0.1 nm für λ und 0.001 für $\lg \varepsilon$ verwendet: λ_{\max} in nm ($\lg \varepsilon$).

3.6.1.4 IR-Spektroskopie

Die IR-Spektren wurden als KBr-Presslinge an einem Bio-Rad FT-IR-Spektrometer FTG 155 aufgenommen.

3.6.1.5 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit Hilfe einer Apparatur nach Dr. Tottoli der Firma Büchi bestimmt.

3.6.1.6 Bestimmung des Drehwerts optisch aktiver Substanzen

Die Drehwerte $[\alpha]_D^{20}$ der optisch aktiven Mono-Aminosäure-Cyclenderivate wurden an einem Polarimeter 241 der Firma Perkin Elmer gemessen. Die Konzentration der Proben betrug dabei jeweils 5 g/l Substanz in Methanol.

3.6.1.7 Chromatographie

Für die Säulenchromatographie (SC) wurde Kieselgel Geduran SI 60, für die Dünnschichtchromatographie (DC) Aluminiumfolien beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄ (Schichtdicke 0.2 mm) der Firma Merck verwendet.

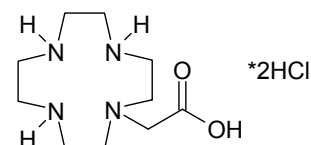
3.6.1.8 Lösungsmittel

Zur Reinigung und Trocknung der Lösungsmittel wurden üblichen Verfahren verwendet (Autorenkollektiv 1988, Hünig *et al.* 1990).

Wenn nicht anders vermerkt, wurden handelsübliche Qualitäten eingesetzt.

3.6.2 Synthese der Verbindungen

10-(2-Essigsäure)-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (**3**, Jeon *et al.* 2002), 10-(2-Aminoethyl)-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (**5**, Reichenbach-Klinke *et al.* 2002), 10-[2-(2-Amino-2-methyl-acetylamido)-ethyl]-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (**111**, Ritter *et al.* 2005) und 10-[2-(2-Amino-3-phenyl-propionylamino)-ethyl]-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (**112**, Ritter *et al.* 2005) wurden nach den Literatur-bekannten Versuchsvorschriften synthetisiert.

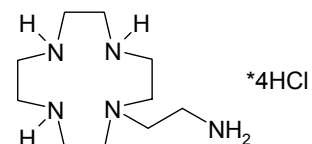


1-(2-Essigsäure)-1,4,7,10-tetraacacyclododecan Hydrochlorid (**13**)

Zu einer Lösung von Boc₃-Cyclen-Ac (**3**) (0.5 mmol, 266 mg) in 10 ml abs. Diethylether wurden bei RT 10 ml HCl ges. Diethylether zugetropft. Die Lösung begann sich nach 30 min zu trüben. Nach 24 h Rühren wurde das LM im Vakuum bei 30°C abgezogen. Der Rückstand wurde im HV getrocknet, in dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

Das Produkt **13** (0.493 mmol, 158 mg, 99%) wurde als farbloses Hydrochloridsalz isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 2.76 - 2.94 (m, 8H, 4·Cyclen-CH₂), 2.99 - 3.10 (m, 8H, 4·Cyclen-CH₂), 3.40 (s, 2H, CH₂-COOH). – MS (+ p ESI, MeCN/H₂O): *m/z* (%) = 231.2 (100) [M+H]⁺. – C₁₀H₂₂N₄O₂·2HCl·H₂O (320.25).

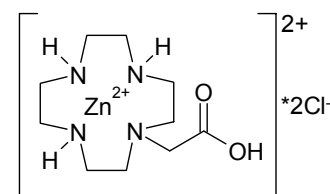


1-(2-Aminoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan Hydrochlorid (15)

Zu einer Lösung von Boc₃-Cyclen-EA (**5**) (0.500 mmol, 258 mg) in 10 ml abs. Diethylether wurden bei RT 10 ml HCl ges. Diethylether zugetropft. Die Lösung begann sich nach 30 min zu trüben. Nach 24 h Rühren wurde das LM im Vakuum bei 30°C abgezogen. Der Rückstand wurde im HV getrocknet, in dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

Das Produkt **15** (0.496 mmol, 188 mg, 99%) wurde als farbloses Hydrochloridsalz isoliert.

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 2.76 - 2.88 (m, 10H, 5-Cyclen-CH₂), 3.00 - 3.13 (m, 10H, 3-Cyclen-CH₂, 2-CH₂). – MS (+ p ESI, MeCN/H₂O): m/z (%) = 108.7 (67) [M+2H⁺]²⁺, 129.1 (100) [M+2H⁺+MeCN]²⁺, 216.2 (35) [M+H⁺]⁺. – C₁₀H₂₅N₅·4HCl·H₂O (379.20).



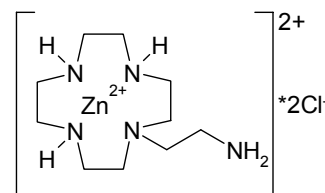
1-(2-Essigsäure)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-Zn(II)-dichlorid (23)

Zu einer Lösung aus Cyclen-Ac-OH (**3**) (0.468 mmol, 150 mg) in 2 ml MeOH wurde bei RT 1 ml 1 M wässrige NaOH-Lösung unter Rühren zugegeben. Anschließend wurde eine Lösung aus wasserfreiem ZnCl₂ (0.744 mmol, 102 mg) in 4 ml MeOH zugetropft. Nach 2 h rühren bei RT wurde die Lösung auf RF erhitzt und 10 h weiter gerührt. Die Lösung wurde in der Siedehitze so lange mit EtOH versetzt, bis sie sich leicht trübte. Anschließend wurde die Reaktionsmischung langsam abgekühlt und über Nacht bei -20°C gelagert. Der Niederschlag wurde über einen Büchnertrichter abgesaugt und mit -20°C kaltem EtOH gewaschen. Die ML wurde eingeeengt und in wenig MeOH/Wasser und EtOH umkristallisiert. Das vereinigte Produkt wurde im HV getrocknet.

Das Produkt **23** (0.417 mmol, 153 mg, 84%) wurde als farbloser Feststoff isoliert.

¹H-NMR (600 MHz): δ = 2.60 - 2.75 (m, 6H, 3-Cyclen-CH₂), 2.78 - 3.10 (m, 10H,

5·Cyclen-CH₂), 3.39 (s, 1H, CH₂-COOH), 3.47 (s, 1H, CH₂-COOH), 4.28 (br, 1H, Cyclen-NH), 4.45 (br, 2H, 2·Cyclen-NH). – ¹³C-NMR (800 MHz): δ = 42.28 (-, Cyclen-CH₂, HSQC), 42.34 (-, Cyclen-CH₂, HSQC), 42.50 (-, Cyclen-CH₂, HSQC), 43.53 (-, Cyclen-CH₂, HSQC), 44.20 (-, Cyclen-CH₂, HSQC), 44.42 (-, Cyclen-CH₂, HSQC), 48.94 (-, Cyclen-CH₂, HSQC), 49.85 (-, Cyclen-CH₂, HSQC), 53.51 (-, CH₂-COOH, HSQC), 173.61 (C_{quart}, COOH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH₄Ac): *m/z* (%) = 293.0 (100) [M-2Cl⁻-H⁺]⁺, 334.0 (22) [M-2Cl⁻-H⁺+MeCN]⁺. – MS (- p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH₄Ac): *m/z* (%) = 365.0 (100) [M-H⁺]⁻, 695.2 (36) [M-Cl⁻-2H⁺]⁻. IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3305, 3053, 2921, 2855, 1643, 1574, 1457, 1371, 1086, 955, 725. – C₁₀H₂₂N₄O₂ZnCl₂ (366.60).



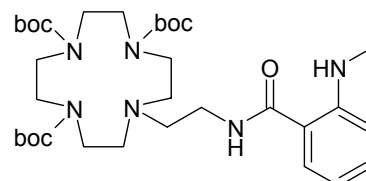
1-(2-aminoethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-Zn(II)-dichlorid (**25**)

Cyclen-EA (**15**) (0.449 mmol, 170 mg) wurde in wenig Wasser gelöst und auf einen mit 200 ml Wasser gespülten Ionenaustauscher III (0.9 mmol/ml, 4.72 mmol, 5.3 ml) aufgetragen. Das Zwischenprodukt wurde mit ca. 100 ml Wasser, bis das Filtrat keine basische Reaktion mehr gegenüber einem pH-Papier zeigte, eluiert. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml eingeeengt und in 5 ml MeOH aufgenommen. Zu dieser Lösung wurde bei RT eine Lösung aus ZnCl₂ (0.785 mmol, 108 mg) in 5 ml MeOH unter Rühren getropft. Die entstandene Suspension wurde auf RF erhitzt und über Nacht weiter gerührt. Nach dem Abkühlen auf -20°C wurde der Niederschlag über einen Büchnertrichter abgesaugt und mit kaltem EtOH gewaschen. Die ML wurde eingeeengt und in wenig MeOH/Wasser und EtOH umkristallisiert. Das vereinigte Produkt wurde im HV getrocknet.

Das Produkt **25** (0.441 mmol, 155 mg, 98%) wurde als farbloser Feststoff isoliert.

¹H-NMR (600 MHz): δ = 2.57 - 2.93 (m, 22H, 8·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N, CH₂-CH₂-N), 3.93 (br, 2H, R-NH₂), 4.03 (br, 2H, 2·Cyclen-NH), 4.12 (br, 1H, Cyclen-NH). – ¹³C-NMR (800 MHz): δ = 37.62 (-, CH₂-NH₂, HSQC), 42.59 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 43.96 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 44.12 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 50.42

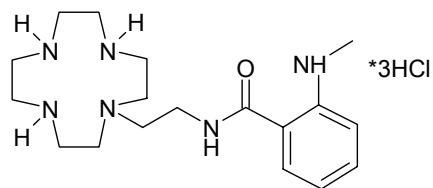
(-, 2-Cyclen-CH₂, HSQC), 50.63 (-, CH₂-CH₂-NH₂, HSQC). – MS (+ p ESI, H₂O/MeCN): m/z (%) = 139.6 (61) [M-2Cl]²⁺, 160.1 (100) [M-2Cl+MeCN]²⁺, 180.6 (48) [M-2Cl+2MeCN]²⁺, 314.0 (34) [M-Cl]⁺. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3291, 3260, 3239, 2932, 2884, 1584, 1469, 1447, 1289, 1086, 1000, 961, 841. – C₁₀H₂₅N₅ZnCl₂ (351.63).



10-[2-(2-Methylamino-benzamido)-ethyl]-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-tert-butylester (50)

Boc₃-Cyclen-EA (**5**) (0.845 mmol, 436 mg) wurde in 15 ml DCM gelöst und unter N₂-Atmosphäre zu einer Lösung aus Mantanhydrid (2.12 mmol, 376 mg) in 15 ml DCM getropft. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 7 h bei RT gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde das LM am Rotationsverdampfer abgezogen und das Rohprodukt dreimal an Chromatographiesäulen (Kieselgel, LM = DCM, PE/EE 1:1, DCM/MeOH 9:1) gereinigt.

Das Produkt **50** (0.609 mmol, 395 mg, 72%) wurde als blasgelber Feststoff isoliert. ¹H-NMR (300 MHz): δ = 1.37 (br, 18H, 2·Boc-(CH₃)₃), 1.39 (br, 9H, Boc-(CH₃)₃), 2.62 - 2.81 (m, 9H, 2·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N, N-CH₃), 3.20 - 3.46 (m, 14H, 6·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N), 6.51 - 6.64 (m, 2H, 2·Ar-CH), 7.24 - 7.32 (m, 1H, Ar-CH), 7.49 (dd, 1H, ³J=8.0 Hz, ⁴J=1.4 Hz, Ar-CH), 7.68 (q, 1H, ³J=4.7 Hz, NH-CH₃), 8.27 (t, 1H, ³J=5.3 Hz, CH₂-CH₂-NH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH₄Ac): m/z (%) = 649.5 (100) [M+H]⁺. – R_f (EE) = 0.73. – C₃₃H₅₆N₆O₇ (648.83).

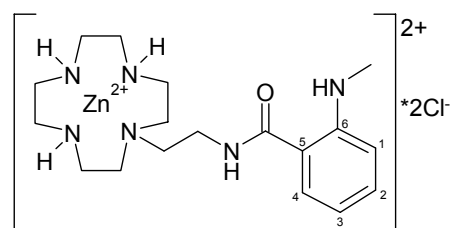


1-[2-(2-Methylamino-benzamido)-ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan

Hydrochlorid (51)

Zu einer Lösung von Boc₃-Cyclen-EA-Mant (**50**) (0.601 mmol, 390 mg) in 12 ml abs. Diethylether wurden bei RT 12 ml HCl ges. Diethylether zugetropft. Die Lösung begann sich nach 30 min trüben. Nach 24 h Rühren wurde das LM im Vakuum bei 30°C abgezogen. Der Rückstand wurde im HV getrocknet, in dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

Das Produkt **51** (0.597 mmol, 295 mg, 99%) wurde als fahl gelber Feststoff isoliert. ¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 2.75 - 2.82 (m, 6H, 2·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N), 2.85 - 2.92 (m, 4H, 2·Cyclen-CH₂), 2.97 (s, 3H, N-CH₃), 3.04 - 3.17 (m, 8H, 4·Cyclen-CH₂), 3.47 (t, 3H, ³J=6.7 Hz, CH₂-CH₂-N), 7.44 - 7.53 (m, 2H, 2·Ar-CH), 7.60 - 7.74 (m, 2H, 2·Ar-CH). – MS (+ p ESI, H₂O/MeCN): *m/z* (%) = 174.9 (100) [M+2H⁺]²⁺, 195.5 (33) [M+2H⁺+MeCN]²⁺, 349.2 (32) [M+H⁺]⁺. – MS (- p ESI, H₂O/MeCN): *m/z* (%) = 383.2 (78) [M+Cl]⁻, 419.2 (100) [M+2Cl⁻+H⁺]⁻. – C₁₈H₃₂N₆O·3HCl·2H₂O (493.90).



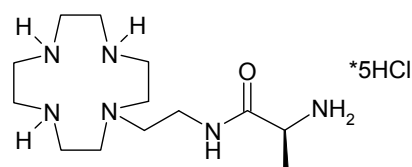
1-[2-(2-Methylamino-benzamido)-ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-Zn(II)-dichlorid (52)

Cyclen-EA-Mant-HCl (**51**) (0.587 mmol, 290 mg) wurde in wenig Wasser gelöst und auf einen mit 200 ml Wasser gespülten Ionenaustauscher III (0.9 mmol/ml, 5.75 mmol, 6.4 ml) aufgetragen. Das Zwischenprodukt wurde mit ca. 120 ml Wasser, bis das Filtrat keine basische Reaktion mehr gegenüber einem pH-Papier zeigte, eluiert. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml eingeeengt und in 6 ml MeOH aufgenommen. Zu dieser Lösung wurde bei RT eine Lösung

aus ZnCl_2 (0.959 mmol, 131 mg) in 8 ml MeOH unter Rühren getropft. Die entstandene Suspension wurde 2 h bei RT gerührt, auf RF erhitzt und über Nacht weiter gerührt. Nach dem Abkühlen auf -20°C wurde der Niederschlag über einen Büchnertrichter abgesaugt und mit kaltem EtOH gewaschen. Die ML wurde eingeengt und in wenig MeOH/Wasser und EtOH umkristallisiert. Das vereinigte Produkt wurde im HV getrocknet.

Das Produkt **52** (0.342 mmol, 166 mg, 58%) konnte als fahl gelber Feststoff isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz): δ = 2.62 - 2.73 (m, 10H, 5-Cyclen- CH_2), 2.74 - 2.79 (m, 5H, Cyclen- CH_2 , N- CH_3), 2.80 - 2.92 (m, 6H, 2-Cyclen- CH_2 , CH_2 - CH_2 -N), 3.42 - 3.52 (m, 2H, CH_2 - CH_2 -N), 4.24 (br, 1H, Cyclen-NH), 4.46 (br, 2H, 2-Cyclen-NH), 6.57 (ddd, 1H, $^3J_{32}=7.8$ Hz, $^3J_{34}=7.0$ Hz, $^4J_{31}=0.9$ Hz, CH(3)), 6.64 (dd, 1H, $^3J_{12}=8.2$ Hz, $^4J_{13}=0.9$ Hz, CH(1)), 7.30 (ddd, 1H, $^3J_{21}=8.3$ Hz, $^3J_{23}=7.0$ Hz, $^4J_{24}=1.4$ Hz, CH(2)), 7.49 (dd, 1H, $^3J_{43}=7.8$ Hz, $^4J_{42}=1.4$ Hz, CH(4)), 7.72 (q, 1H, $^3J=5.0$ Hz, NH-Me), 8.41 (t, 1H, $^3J=5.8$ Hz, CH_2 -NH-CO). – $^{13}\text{C-NMR}$ (800 MHz): δ = 29.26 (+, CH_3 -NH, HSQC), 32.94 (-, CH_2 -NH-CO, HSQC), 42.17 (-, 2-Cyclen- CH_2 , HSQC), 43.37 (-, 2-Cyclen- CH_2 , HSQC), 44.24 (-, 2-Cyclen- CH_2 , HSQC), 48.90 (-, 2-Cyclen- CH_2 , HSQC), 51.40 (-, CH_2 - CH_2 -NH-CO, HSQC), 110.68 (+, CH(1), HSQC, HMBC), 113.97 (+, CH(3), HSQC, HMBC), 114.45 (C_{quart} , C(5), HMBC), 128.03 (+, CH(4), HSQC, HMBC), 132.58 (+, CH(2), HSQC, HMBC), 150.20 (C_{quart} , C(6), HMBC), 169.17 (C_{quart} , CO, HMBC). – MS (+ p ESI, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$): m/z (%) = 206.6 (8) $[\text{M}-2\text{Cl}]^{2+}$, 411.2 (100) $[\text{M}-2\text{Cl}-\text{H}^+]^+$, 447.2 (36) $[\text{M}-\text{Cl}]^+$. UV/VIS (H_2O , pH 6, 22°C): λ [nm] ($\lg \varepsilon$) = 214.0 (4.233), 252.0 (3.778), 332.1 (3.362). – MP $> 200^\circ\text{C}$. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3412, 3385, 3251, 2932, 2881, 1620, 1575, 1547, 1519, 1470, 1273, 1177, 1090, 978, 857, 746. – $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{OZnCl}_2$ (484.78).



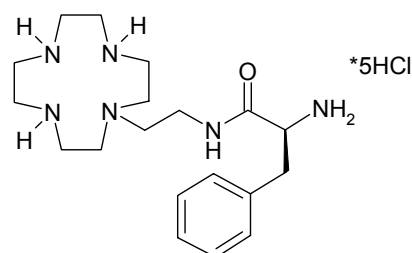
1-[2-(2-Amino-2-methyl-acetylamido)-ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan

Hydrochlorid (121)

Zu einer Lösung von Boc₃-Cyclen-EA-Ala (**111**) (0.213 mmol, 125 mg) in 4.3 ml abs. Diethylether wurden bei RT 4.3 ml HCl ges. Diethylether zugetropft. Die Lösung begann sich nach 30 min zu trüben. Nach 24 h Rühren wurde das LM im Vakuum bei 30°C abgezogen. Der Rückstand wurde im HV getrocknet, in dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

Das Produkt **121** (0.212 mmol, 107 mg, quant.) wurde als farbloser Feststoff isoliert.

¹H-NMR (300 MHz): δ = 1.35 (d, 3H, ³J=6.9 Hz, Ala-CH₃), 2.60 - 2.69 (m, 2H, CH₂-CH₂-N), 2.80 - 2.97 (m, 4H, 2·Cyclen-CH₂), 3.10 - 3.58 (m, 14H, 6·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N), 3.80 - 3.94 (m, 1H, Ala-H_α), 5.33 (br, 7H, Cyclen-NH, 3·Cyclen-NH₂), 8.27 (br, 3H, Ala-NH₃), 8.73 (br, 1H, CH₂-CH₂-NH). – MS (+ p ESI, H₂O/MeCN): m/z (%) = 96.5 (14) [M+3H⁺]³⁺, 110.1 (54) [M+3H⁺+MeCN]³⁺, 123.8 (50) [M+3H⁺+2MeCN]³⁺, 137.5 (29) [M+3H⁺+3MeCN]³⁺, 144.1 (100) [M+2H⁺]²⁺, 164.6 (99) [M+2H⁺+MeCN]²⁺, 287.3 (30) [M+H⁺]⁺. – C₁₃H₃₀N₆O·5HCl·2H₂O (504.75).



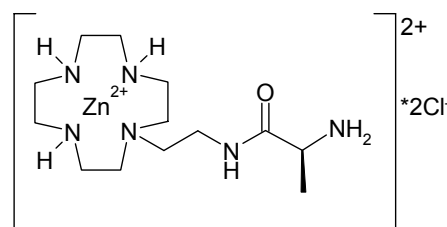
1-[2-(2-Amino-2-benzyl-acetylamido)-ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan

Hydrochlorid (122)

Zu einer Lösung von Boc₃-Cyclen-EA-Phe (**112**) (0.195 mmol, 129 mg) in 3.9 ml abs. Diethylether wurden bei RT 3.9 ml HCl ges. Diethylether zugetropft. Die Lösung begann sich nach 30 min zu trüben. Nach 24 h Rühren wurde das LM im Vakuum bei 30°C abgezogen. Der Rückstand wurde im HV getrocknet, in dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

Das Produkt **122** (0.194 mmol, 109 mg, quant.) wurde als farbloser Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): δ = 2.69 - 3.64 (m, 22H, 8·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N, CH₂-CH₂-N), 3.94 - 4.14 (m, 1H, Phe-H_α), 4.92 (br, 7H, Cyclen-NH, 3·Cyclen-NH₂), 7.23 - 7.38 (m, 5H, 5·Ar-CH), 8.35 (br, 3H, Phe-NH₃), 8.73 (br, 1H, CH₂-CH₂-NH). – MS (+ p ESI, H₂O/MeCN): m/z (%) = 121.7 (14) [M+3H⁺]³⁺, 135.4 (21) [M+3H⁺+MeCN]³⁺, 149.0 (29) [M+3H⁺+2MeCN]³⁺, 162.7 (23) [M+3H⁺+3MeCN]³⁺, 182.0 (100) [M+2H⁺]²⁺, 202.5 (11) [M+2H⁺+MeCN]²⁺, 363.3 (31) [M+H⁺]⁺. – C₁₉H₃₄N₆O·5HCl·H₂O (562.83).



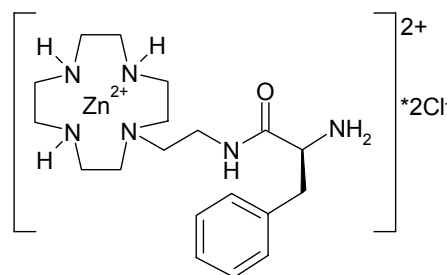
1-[2-(2-Amino-2-methyl-acetylamido)-ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-Zn(II)-dichlorid (**131**)

Zu einer Lösung von Cyclen-EA-Ala-HCl (**121**) (0.206 mmol, 104 mg) in 3 ml MeOH wurden bei RT 660 μl 1 M wässrige NaOH-Lösung unter Rühren zugegeben. Anschließend wurde eine Lösung aus wasserfreiem ZnCl₂ (0.394 mmol, 54 mg) in 3 ml MeOH zugetropft und die Reaktionslösung auf RF erhitzt. Nach 16 h Rühren wurde die Lösung in der Siedehitze so lange mit EtOH versetzt, bis sie sich leicht trübte. Anschließend wurde die Reaktionsmischung langsam abgekühlt und über Nacht bei -20°C gelagert. Der Niederschlag wurde über einen Büchnertrichter abgesaugt und mit -20°C kaltem EtOH gewaschen. Die ML wurde eingengt und in wenig MeOH/Wasser und EtOH umkristallisiert. Das vereinigte Produkt wurde im HV getrocknet.

Das Produkt **131** (0.083 mmol, 36 mg, 40%) konnte als rosafarbener Feststoff isoliert werden.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz): δ = 1.33 (d, 3H, $^3J=6.9$ Hz, Ala-CH₃), 2.63 - 2.89 (m, 18H, 8·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N), 3.38 - 3.42 (m, 2H, CH₂-CH₂-N), 3.79 - 3.84 (m, 1H, Ala-H_α), 4.25 (br, 1H, Cyclen-NH), 4.47 (br, 2H, 2·Cyclen-NH), 8.13 (br, 2H, Ala-NH₂), 8.57 (t, 1H, $^3J=5.8$ Hz, CH₂-NH-CO). – $^{13}\text{C-NMR}$ (800 MHz): δ = 17.04

(+, Ala-CH₃, HSQC), 33.00 (-, CH₂-NH-CO, HSQC), 42.06 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 43.38 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 44.27 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 48.26 (+, Ala-C_α, HSQC), 48.92 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 51.33 (-, CH₂-CH₂-NH-CO, HSQC), 169.45 (C_{quart}, CO, HMBC). – MS (+ p ESI, H₂O/MeCN): *m/z* (%) = 174.9 (100) [M-2Cl]²⁺, 192.9 (24) [M+H⁺-Cl]²⁺, 195.4 (30) [M-2Cl+MeCN]²⁺, 213.4 (24) [M+H⁺-Cl+MeCN]²⁺, 385.1 (5) [M-Cl]⁺. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3468, 3278, 3091, 2874, 1676, 1553, 1468, 1396, 1273, 1200, 1130, 1088, 967, 758. – $[\alpha]_D^{20}$ = +4.0°. – C₁₃H₃₀N₆OZnCl₂ (422.71).



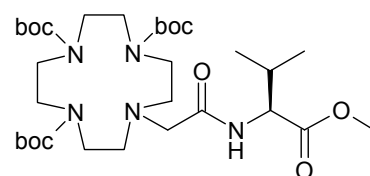
1-[2-(2-Amino-2-benzyl-acetylamido)-ethyl]-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-Zn(II)-dichlorid (132)

Zu einer Lösung von Cyclen-EA-Phe-HCl (**122**) (0.185 mmol, 104 mg) in 2 ml MeOH wurden bei RT 550 μ l 1 M wässrige NaOH-Lösung unter Rühren zugegeben. Anschließend wurde eine Lösung aus wasserfreiem ZnCl₂ (0.331 mmol, 46 mg) in 2.5 ml MeOH zugetropft und die Reaktionslösung auf RF erhitzt. Nach 16 h Rühren wurde die Lösung in der Siedehitze so lange mit EtOH versetzt, bis sie sich leicht trübte. Anschließend wurde die Reaktionsmischung langsam abgekühlt und über Nacht bei -20°C gelagert. Der Niederschlag wurde über einen Büchnertrichter abgesaugt und mit -20°C kaltem EtOH gewaschen. Die ML wurde eingengt und in wenig MeOH/Wasser und EtOH umkristallisiert. Das vereinigte Produkt wurde im HV getrocknet.

Das Produkt **132** (0.120 mmol, 60 mg, 65%) konnte als blas gelber Feststoff isoliert werden.

¹H-NMR (600 MHz): δ = 2.62 - 2.84 (m, 19H, 8·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N, 1·Phe-H_β), 2.92 - 2.97 (m, 1H, 1·Phe-H_β), 3.28 - 3.32 (m, 2H, CH₂-CH₂-N), 3.55 - 3.61 (m, 1H, Phe-H_α), 4.23 (br, 1H, Cyclen-NH), 4.48 (br, 2H, 2·Cyclen-NH), 7.20 (d, 2H, ³J_{om}=7.5 Hz Ar-CH(o)), 7.23 (dd, 1H, ³J_{pm}=7.5 Hz Ar-CH(p)), 7.32 (dd, 2H,

$^3J_{\text{mo}}=^3J_{\text{mp}}=7.5$ Hz Ar-CH(m)), 8.18 (br, 1H, NH-CO). – ^{13}C -NMR (800 MHz): δ = 32.67 (-, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-NH-CO}$, HSQC), 39.48 (-, Phe- C_β , HSQC), 42.14 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 43.36 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 44.25 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 48.90 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 51.22 (-, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CO}$, HSQC), 55.30 (+, Phe- C_α , HSQC), 126.57 (+, 2·CH(o), HSQC, HMBC), 128.37 (+, CH(p), HSQC, HMBC), 129.36 (+, 2·CH(m), HSQC, HMBC), 137.12 (C_{quart} , $\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{-(CH)}_2$, HMBC), 160.01 (C_{quart} , CO, HMBC). – MS (+ p ESI, $\text{H}_2\text{O/MeCN}$): m/z (%) = 212.9 (100) $[\text{M-2Cl}]^{2+}$, 231.0 (15) $[\text{M+H}^+\text{-Cl}]^{2+}$, 251.5 (6) $[\text{M+H}^+\text{-Cl+MeCN}]^{2+}$, 425.1 (92) $[\text{M-H}^+\text{-2Cl}]^+$, 461.2 (16) $[\text{M-Cl}]^+$. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3454, 3253, 3100, 2934, 2882, 1673, 1632, 1552, 1476, 1452, 1283, 1254, 1132, 1090, 1043, 978, 751, 705. – $[\alpha]_D^{20} = +21.0^\circ$. – $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{OZnCl}_2$ (498.81)



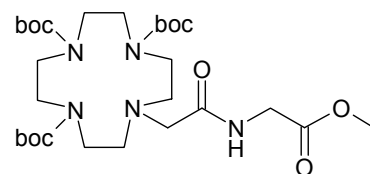
10-(2-Acetylamido-3-methyl-buttersäure-methylester)-1,4,7,10-tetraacacetylcyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (201)

Unter Eisbadkühlung wurden bei 0°C Boc₃-Cyclen-Ac (**3**) (1.68 mmol, 894 mg), HOBT (1.85 mmol, 251 mg), DIEA (15.2 mmol, 2.6 ml) und HBTU (1.85 mmol, 703 mg) in wenig DCM/DMF 1:1 gelöst und 10 min lang gerührt. L-Val-OMe·HCl (1.85 mmol, 311 mg) wurde, in wenig DCM/DMF 1:1 gelöst, zugegeben und das Eisbad entfernt. Die Reaktionslösung wurde 5 h bei RT und weitere 40 h bei 40°C gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde die Reaktionslösung mit 50 ml wässrige NaHCO_3 -Lösung (10% ges.) versetzt und 3 mal mit 30 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das LM am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (LM = PE/EE 4:6 → 2:8) gereinigt.

Das Produkt **201** (1.63 mmol, 1.05 g, 97%) wurde als fahl gelber Feststoff isoliert.

^1H -NMR (300 MHz): δ = 0.87 (2d, 6H, $^3J=6.7$ Hz, 2·Val- CH_3), 1.37 (br, 18H, 2·Boc-(CH_3)₃), 1.39 (br, 9H, Boc-(CH_3)₃), 1.96 - 2.09 (m, 1H, Val- H_β), 2.61 - 2.84 (m, 4H, 2·Cyclen- CH_2), 3.14 - 3.49 (m, 14H, 6·Cyclen- CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CO}$), 3.63 (s, 3H, O- CH_3), 4.19 (dd, 1H, $^3J=8.0$ Hz, $^3J=6.7$ Hz, Val- H_α), 8.28 (d, 1H, $^3J=8.0$ Hz, Val-NH). –

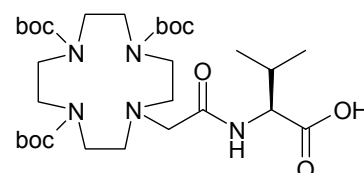
MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH₄Ac): m/z (%) = 644.6 (100) [M+H]⁺, 666.5 (5) [M+Na]⁺. – R_f (EE) = 0.65. – C₃₁H₅₇N₅O₉ (643.81).



10-(2-Acetylamido-essigsäure-methylester)-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (203)

Unter Eisbadkühlung wurden bei 0°C Boc₃-Cyclen-Ac (**3**) (2.83 mmol, 1.50 g), HOBT (3.11 mmol, 421 mg), DIEA (25.5 mmol, 4.4 ml) und HBTU (3.11 mmol, 1.18 g) in wenig DMF gelöst und 15 min lang gerührt. Gly-OMe·HCl (3.11 mmol, 391 mg) wurde, in wenig DMF gelöst, zugegeben und das Eisbad entfernt. Die Reaktionslösung wurde 48 h bei RT gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde die Reaktionslösung mit 50 ml ges. wässrige NH₄Cl-Lösung versetzt und 3 mal mit 30 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das LM am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (LM = EE/PE 9:1) gereinigt.

Das Produkt **203** (2.76 mmol, 1.66 g, 98%) wurde als fahl gelber Feststoff isoliert. ¹H-NMR (300 MHz): δ = 1.37 (br, 18H, 2·Boc-(CH₃)₃), 1.39 (br, 9H, Boc-(CH₃)₃), 2.70 - 2.79 (m, 4H, 2-Cyclen-CH₂), 3.21 - 3.50 (m, 14H, 6-Cyclen-CH₂, CH₂-CO), 3.62 (s, 3H, O-CH₃), 3.84 (d, 2H, ³J=5.8 Hz, Gly-CH₂), 8.28 (t, 1H, ³J=5.8 Hz, Val-NH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH₄Ac): m/z (%) = 602.4 (100) [M+H]⁺, 608.4 (8) [M+Li]⁺. – R_f (EE) = 0.37. – C₂₈H₅₁N₅O₉ (601.73).

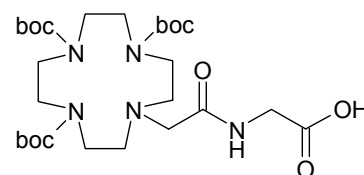


10-(2-Acetylamido-3-methyl-buttersäure)-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (211)

Boc₃-Cyclen-Ac-Val-OMe (**201**) (1.62 mmol, 1.05 g) wurde in 50 ml MeOH/H₂O 3:1 gelöst und mit LiOH·H₂O (2.20 mmol, 92 mg) versetzt. Die Lösung wurde 96 h bei

RT gerührt, bis kein Edukt mehr im DC (LM = EE) zu sehen war. Die Reaktionslösung wurde mit 50 ml ges. wässrige NH_4Cl -Lösung versetzt und 3 mal mit 50 ml DCM extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 1 M HCl auf pH 3 gebracht und anschließend noch 2 mal mit 50 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das LM am Rotationsverdampfer entfernt.

Das Produkt **211** (1.52 mmol, 960 mg, 94%) wurde als fahl gelber Feststoff isoliert. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): δ = 0.87 (d, 6H, $^3J=6.9$ Hz, 2·Val- CH_3), 1.37 (br, 18H, 2·Boc-(CH_3)₃), 1.40 (br, 9H, Boc-(CH_3)₃), 2.01 - 2.12 (m, 1H, Val- H_β), 2.61 - 2.87 (m, 4H, 2·Cyclen- CH_2), 3.12 - 3.52 (m, 14H, 6·Cyclen- CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CO}$), 4.18 (dd, 1H, $^3J=8.0$ Hz, $^3J=5.9$ Hz, Val- H_α), 8.14 (d, 1H, $^3J=8.0$ Hz, Val-NH), 12.70 (br, 1H, COOH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH_4Ac): m/z (%) = 630.5 (100) $[\text{M}+\text{H}^+]^+$. – $\text{C}_{30}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_9$ (629.79).

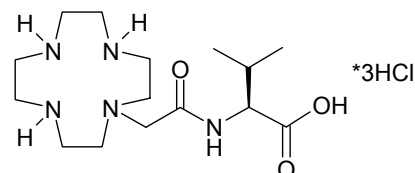


10-(2-Acetylamido-essigsäure)-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (**213**)

Boc₃-Cyclen-Ac-Gly-OMe (**203**) (2.73 mmol, 1.64 g) wurde in 75 ml Aceton/ H_2O 4:1 gelöst und mit $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (3.55 mmol, 150 mg) versetzt und 36 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das LM am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (LM = DCM/MeOH 9:1 → 2:1) gereinigt.

Das Produkt **213** (2.06 mmol, 1.21 g, 75%) wurde als farbloser Feststoff isoliert.

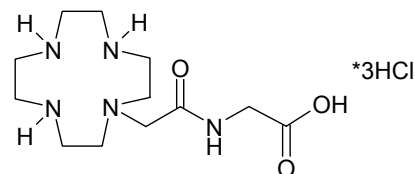
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): δ = 1.36 (br, 18H, 2·Boc-(CH_3)₃), 1.39 (br, 9H, Boc-(CH_3)₃), 2.70 - 2.81 (m, 4H, 2·Cyclen- CH_2), 3.19 - 3.51 (m, 14H, 6·Cyclen- CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CO}$), 3.54 (d, 2H, $^3J=4.9$ Hz, Gly- CH_2), 7.83 (t, 1H, $^3J=4.9$ Hz, Gly-NH), 9.87 (br, 1H, COOH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH_4Ac): m/z (%) = 588.4 (100) $[\text{M}+\text{H}^+]^+$, 610.4 (5) $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$. – R_f (DCM/MeOH 1:1) = 0.54. – $\text{C}_{27}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_9$ (587.71).



1-(2-Acetylamido-3-methyl-buttersäure)-1,4,7,10-tetraacacyclododecan Hydrochlorid (221)

Unter N₂-Atmosphäre wurde zu einer Lösung von Boc₃-Cyclen-Ac-Val-OH (**211**) (0.318 mmol, 200 mg) in 6.4 ml abs. Diethylether bei RT 6.4 ml HCl ges. Diethylether zugetropft. Die Lösung begann sich nach 30 min zu trüben. Nach 24 h Rühren wurde das LM im Vakuum bei 30°C abgezogen. Der Rückstand wurde im HV getrocknet, in dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

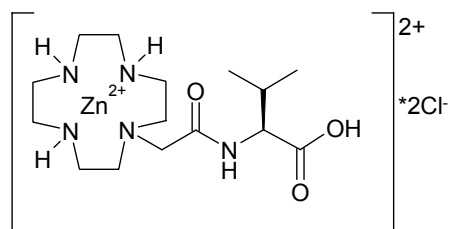
Das Produkt **221** (0.312 mmol, 137 mg, 98%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. ¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 0.91 (2d, 6H, ³J=6.9 Hz, 2·Val-CH₃), 2.11 - 2.24 (m, 1H, Val-H_β), 2.76 - 3.20 (m, 16H, 8·Cyclen-CH₂), 3.50 (s, 2H, CH₂-CO), 4.22 (s, 1H, ³J=5.8 Hz, Val-H_α). – MS (+ p ESI, H₂O/MeCN): *m/z* (%) = 165.5 (68) [M+2H⁺]²⁺, 186.0 (100) [M+2H⁺+MeCN]²⁺, 330.2 (24) [M+H⁺]⁺. – C₁₅H₃₁N₅O₃·3HCl (438.82).



1-[2-Acetylamido-essigsäure]-1,4,7,10-tetraacacyclododecan Hydrochlorid (223)

Unter N₂-Atmosphäre wurde zu einer Lösung von Boc₃-Cyclen-Ac-Gly-OH (**213**) (0.340 mmol, 200 mg) in 6.8 ml abs. DCM bei RT 6.8 ml HCl ges. Diethylether zugetropft. Die Lösung begann sich nach 30 min zu trüben. Nach 24 h Rühren wurde das LM im Vakuum bei 30°C abgezogen. Der Rückstand wurde im HV getrocknet, in dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

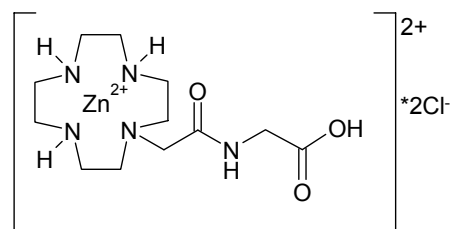
Das Produkt **223** (0.338 mmol, 140 mg, 99%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. ¹H-NMR (300 MHz): δ = 2.76 - 3.59 (m, 18H, 8·Cyclen-CH₂, CH₂-CO), 3.80 (d, 2H, ³J=5.6 Hz, Gly-CH₂), 4.17 (br, 6H, 3·Cyclen-NH₂), 8.70 (br, 1H, Gly-NH), 10.14 (br, 1H, COOH). – MS (+ p ESI, H₂O/MeCN): *m/z* (%) = 144.5 (17) [M+2H⁺]²⁺, 164.9 (100) [M+2H⁺+MeCN]²⁺, 185.4 (25) [M+2H⁺+2MeCN]²⁺, 288.1 (63) [M+H⁺]⁺. – C₁₂H₂₅N₅O₃·3HCl·H₂O (414.76).



1-(2-Acetylamido-3-methyl-buttersäure)-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-Zn(II)-dichlorid (231)

Zu einer Lösung von Cyclen-Ac-Val-HCl (**221**) (0.308 mmol, 135 mg) in 3.5 ml MeOH wurden bei RT 670 μ l 1 M wässrige NaOH-Lösung unter Rühren zugegeben. Anschließend wurde eine Lösung aus wasserfreiem ZnCl_2 (0.504 mmol, 69 mg) in 3.5 ml MeOH zugetropft und die Reaktionslösung 2 h bei RT und 16 h bei RF gerührt. Die Lösung wurde daraufhin so lange in der Siedehitze mit EtOH versetzt, bis sie sich leicht trübte. Anschließend wurde die Reaktionsmischung langsam abgekühlt und über Nacht bei -20°C gelagert. Der Niederschlag wurde über einen Büchnertrichter abgesaugt und mit -20°C kaltem EtOH gewaschen. Die ML wurde eingeeengt und in wenig MeOH/Wasser und EtOH umkristallisiert. Das vereinigte Produkt wurde im HV getrocknet.

Das Produkt **231** (0.247 mmol, 115 mg, 80%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz): δ = 0.86 - 0.92 (m, 6H, 2·Val- CH_3), 2.04 - 2.12 (m, 1H, Val- H_β), 2.62 - 3.09 (m, 16H, 8·Cyclen- CH_2), 3.40 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-CO}$), 4.17 (dd, 0.5H, $^3J=8.3$ Hz, $^3J=5.8$ Hz, Val- H_α), 4.21 (dd, 0.5H, $^3J=8.3$ Hz, $^3J=5.8$ Hz, Val- H_α), 4.29 (br, 1H, Cyclen-NH), 4.44 (br, 2H, 2·Cyclen-NH), 8.51 (d, 0.5H, $^3J=8.4$ Hz, Val-NH), 8.55 (d, 0.5H, $^3J=8.4$ Hz, Val-NH), 12.38 (br, 1H, COOH). – $^{13}\text{C-NMR}$ (800 MHz): δ = 18.06 (+, Val- CH_3 , HSQC), 19.16 (+, Val- CH_3 , HSQC), 29.45 (+, 0.5·Val- C_β , HSQC), 29.84 (+, 0.5·Val- C_β , HSQC), 42.33 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 43.48 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 44.34 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 49.58 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 54.35 (-, $\text{CH}_2\text{-CO}$, HSQC), 56.99 (+, 0.5·Val- C_α , HSQC), 57.42 (+, 0.5·Val- C_α , HSQC), 168.38 (C_{quart} , CO, HMBC), 172.56 (C_{quart} , COOH, HMBC). – MS (+ p ESI, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$): m/z (%) = 217.0 (13) $[\text{M}-2\text{Cl}^-+\text{MeCN}]^{2+}$, 392.2 (100) $[\text{M}-\text{H}^+-2\text{Cl}^-]^+$. – MS (- p ESI, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$): m/z (%) = 428.2 (12) $[\text{M}-\text{Cl}^-+2\text{H}^+]$, 464.1 (100) $[\text{M}-\text{H}^+]$, 522.2 (24) $[\text{M}-\text{H}^+-3\text{Cl}^-+\text{Na}^+]$. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3454, 3306, 3059, 2968, 2875, 1728, 1655, 1546, 1460, 1401, 1201, 1140, 1086, 950, 777, 749. – $[\alpha]_D^{20}$ = -4.6° . – $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_3\text{ZnCl}_2$ (465.73).

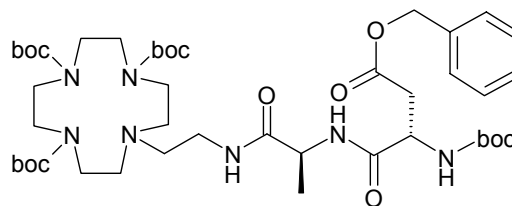


1-(2-Acetylamido-essigsäure)-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-Zn(II)-dichlorid (**233**)

Zu einer Lösung von Cyclen-Ac-Gly·HCl (**223**) (0.333 mmol, 138 mg) in 5 ml MeOH wurden bei RT 960 µl 1 M wässrige NaOH-Lösung unter Rühren zugegeben. Anschließend wurde eine Lösung aus wasserfreiem ZnCl₂ (0.575 mmol, 79 mg) in 5 ml MeOH zugetropft, die Reaktionslösung auf RF erhitzt und 16 h bei RF gerührt. Die Lösung wurde daraufhin so lange in der Siedehitze mit EtOH versetzt, bis sie sich leicht trübte. Anschließend wurde die Reaktionsmischung langsam abgekühlt und über Nacht bei -20°C gelagert. Der Niederschlag wurde über einen Büchnertrichter abgesaugt und mit -20°C kaltem EtOH gewaschen. Die ML wurde eingengt und in wenig MeOH/Wasser und EtOH umkristallisiert. Das vereinigte Produkt wurde im HV getrocknet.

Das Produkt **233** (0.300 mmol, 127 mg, 90%) konnte als farbloser Feststoff isoliert werden.

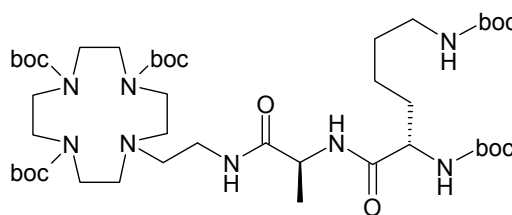
¹H-NMR (600 MHz): δ = 2.39 - 2.44 (m, 2H, Cyclen-CH₂), 2.55 - 2.64 (m, 10H, 5·Cyclen-CH₂), 2.67 - 2.73 (m, 2H, Cyclen-CH₂), 2.80 - 2.87 (m, 4H, Cyclen-CH₂, CH₂-CO), 3.14 (br, 1H, Cyclen-NH), 3.28 (br, 2H, Gly-CH₂), 3.89 (br, 2H, 2·Cyclen-NH). – ¹³C-NMR (800 MHz): δ = 43.43 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 44.14 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 44.46 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 48.55 (-, Gly-C_α, HSQC), 52.98 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 60.26 (-, CH₂CO, HSQC), 169.31 (C_{quart}, CO, HMBC), 177.65 (C_{quart}, COOH, HMBC). – MS (+ p ESI, H₂O/MeCN): *m/z* (%) = 175.4 (9) [M-2Cl]²⁺, 195.5 (9) [M-2Cl+MeCN]²⁺, 350.1 (100) [M-H⁺-2Cl]⁺, 386.0 (7) [M-Cl⁻-H⁺]⁺. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3427, 3259, 2936, 2876, 1644, 1593, 1446, 1296, 1092, 968, 881, 856, 695. – C₁₂H₂₅N₅O₃ZnCl₂ (423.65)



10-{2-[2-[2-(*tert*-Butylcarbonylamido)-1-succinoylamido-3-benzylester]-2-methyl-acetylamido]-ethyl}-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (**301**)

Unter N₂-Atmosphäre wurden bei 0°C Boc-L-Asp(OBzl)-OH (0.385 mmol, 125 mg), HOBT (0.424 mmol, 58 mg), DIEA (3.15 mmol, 0.55 ml) und HBTU (0.424 mmol, 161 mg) in wenig DMF gelöst und 5 min lang gerührt. Boc₃-Cyclen-EA-Ala (**111**) (0.350 mmol, 206 mg) wurde, in wenig DMF gelöst, zugegeben, das Eisbad entfernt und weitere 48 h bei RT gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde die Reaktionslösung mit 30 ml dest. Wasser versetzt und 2 mal mit 50 ml DCM extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 20 ml halb-ges. wässriger NaHCO₃-Lösung versetzt und abermals mit 3 mal 40 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das LM am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (LM = DCM/MeOH 9:1) gereinigt.

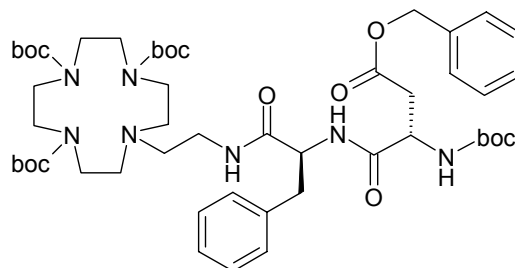
Das Produkt **301** (0.322 mmol, 287 mg, 92%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. ¹H-NMR (300 MHz): δ = 1.17 (d, 3H, ³J=7.1 Hz, Ala-CH₃), 1.32 - 1.42 (m, 36H, 4·Boc-(CH₃)₃), 2.56 - 2.85 (m, 8H, 3·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N), 3.10 - 3.48 (m, 14H, 5·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N, Asp-CH₂), 4.13 - 4.38 (m, 2H, Ala-H_α, Asp-H_α), 5.09 (d, 2H, ⁴J=2.2 Hz, CH₂-Ph), 7.25 (d, 1H, ³J=8.0 Hz, Asp-NH), 7.32 - 7.39 (m, 5H, O-CH₂-C₆H₅), 7.84 - 7.91 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH, Ala-NH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH₄Ac): *m/z* (%) = 892.6 (100) [M+H]⁺, 914.5 (8) [M+Na]⁺. – R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.70. – C₄₄H₇₃N₇O₁₂ (892.09).



10-{2-[2-[2,6-(di-*tert*-Butylcarbonylamido)-hexanoylamido]-2-methyl-acetylamido]-ethyl}-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (**302**)

Unter N₂-Atmosphäre wurden bei 0°C Boc-L-Lys(Boc)-OH·DCHA (0.405 mmol, 214 mg), HOBT (0.446 mmol, 60 mg) und HBTU (0.446 mmol, 169 mg) in wenig DMF gelöst und 5 min lang gerührt. Boc₃-Cyclen-EA (**5**) (0.485 mmol, 250 mg) wurde, in wenig DMF gelöst, zugegeben, das Eisbad entfernt und weitere 48 h bei RT gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde die Reaktionslösung mit 40 ml ges. wässriger NH₄Cl-Lösung versetzt und 3 mal mit 30 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das LM am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde 2 mal säulen-chromatographisch an Kieselgel (LM = EE/PE 9:1, DCM/MeOH 9:1) gereinigt.

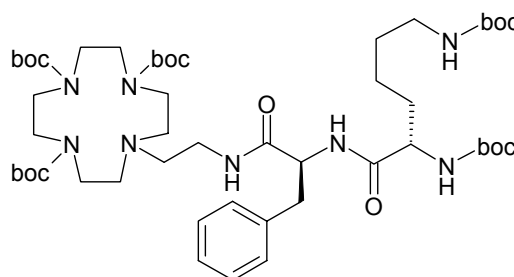
Das Produkt **302** (0.262 mmol, 240 mg, 71%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. ¹H-NMR (300 MHz): δ = 1.17 (d, 3H, ³J=7.1 Hz, Ala-CH₃), 1.21 - 1.61 (m, 51H, 5·Boc-(CH₃)₃, 2·Lys-H_β, 2·Lys-H_γ, 2·Lys-H_δ), 2.56 - 2.70 (m, 6H, 2·Cyclen-CH₂, 2·Lys-H_ε), 2.82 - 2.91 (m, 2H, CH₂-CH₂-N), 3.10 - 3.49 (m, 14H, 6·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N), 3.78 - 3.88 (m, 1H, Lys-H_α), 4.15 - 4.25 (m, 1H, Ala-H_α), 6.77 (t, 1H, ³J=5.6 Hz, Lys-NH_ζ), 6.92 (d, 1H, ³J=7.7 Hz, Lys-NH), 7.81 (d, 1H, ³J=7.7 Hz, Ala-NH), 7.88 (t, 1H, ³J=4.8 Hz, CH₂-CH₂-NH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH₄Ac): *m/z* (%) = 915.7 (100) [M+H⁺]⁺, 937.6 (7) [M+Na⁺]⁺. – R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.47. – C₄₄H₈₂N₈O₁₂ (915.17).



10-{2-[2-[2-(*tert*-Butylcarbonylamido)-1-succinoylamido-3-benzylester]-2-benzylacetyl]-ethyl}-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (**303**)

Unter N₂-Atmosphäre wurden bei RT Boc-L-Asp(OBzl)-OH (0.318 mmol, 103 mg), HOBT (0.351 mmol, 48 mg), DIEA (2.25 mmol, 0.39 ml) und HBTU (0.351 mmol, 133 mg) in wenig DMF gelöst und 5 min lang gerührt. Boc₃-Cyclen-EA-Phe (**112**) (0.290 mmol, 192 mg) wurde, in wenig DMF gelöst, zugegeben, das Eisbad entfernt und weitere 48 h bei RT gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde die Reaktionslösung mit 30 ml ges. wässriger NH₄Cl-Lösung versetzt und 3 mal mit 30 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das LM am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (LM = DCM/MeOH 9:1) gereinigt.

Das Produkt **303** (0.281 mmol, 272 mg, 97%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. ¹H-NMR (300 MHz): δ = 1.36 (br, 18H, 2·Boc-(CH₃)₃), 1.39 (br, 9H, Boc-(CH₃)₃), 2.54 - 2.99 (m, 10H, 4·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N), 3.06 - 3.48 (m, 16H, 4·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N, 2·Asp-H_β, 2·Phe-H_β), 4.25 - 4.45 (m, 2H, Asp-H_α, Phe-H_α), 5.08 (br, 2H, O-CH₂-Ph), 7.14 - 7.27 (m, 6H, 5·Ar. Phe-CH, Asp-NH), 7.30 - 7.39 (m, 5H, O-CH₂-C₆H₅), 7.83 - 7.99 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH, Phe-NH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH₄Ac): *m/z* (%) = 968.6 (100) [M+H]⁺, 990.6 (8) [M+Na]⁺. – R_f(EE) = 0.71. – C₅₀H₇₇N₇O₁₂ (968.19).

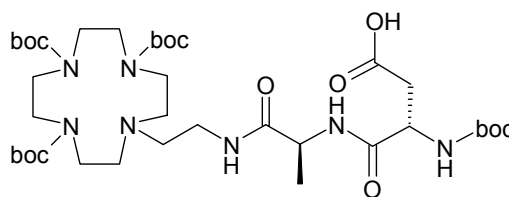


10-{2-[2-[2,6-(di-*tert*-Butylcarbonylamido)-hexanoylamido]-2-benzyl-acetylamido]-ethyl}-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (**304**)

Unter N₂-Atmosphäre wurden bei RT Boc-L-Lys(Boc)-OH·DCHA (0.275 mmol, 146 mg), HOBt (0.303 mmol, 41 mg), DIEA (2.25 mmol, 0.39 ml) und HBTU (0.303 mmol, 115 mg) in wenig DMF gelöst und 5 min lang gerührt. Anschließend wurde Boc₃-Cyclen-EA-Phe (**112**) (0.250 mmol, 166 mg), in wenig DMF gelöst, zugegeben und weitere 48 h bei RT gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde die Reaktionslösung mit 30 ml ges. wässriger NH₄Cl-Lösung versetzt und 3 mal mit 30 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das LM am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (LM = EE/PE 9:1) gereinigt.

Das Produkt **304** (0.242 mmol, 240 mg, 97%) wurde als farbloser Feststoff isoliert.

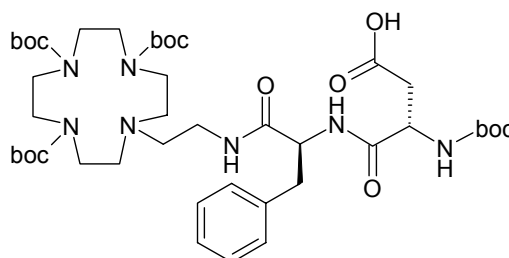
¹H-NMR (300 MHz): δ = 1.00 - 1.47 (m, 51H, 5·Boc-(CH₃)₃, 2·Lys-H_β, 2·Lys-H_γ, 2·Lys-H_δ), 2.54 - 2.66 (m, 6H, 2·Cyclen-CH₂, 2·Lys-H_ε), 2.76 - 2.97 (m, 4H, CH₂-CH₂-N, 2·Phe-H_β), 3.03 - 3.49 (m, 14H, 6·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N), 3.71 - 3.82 (m, 1H, Lys-H_α), 4.39 - 4.49 (m, 1H, Phe-H_α), 6.76 (t, 1H, ³J=5.5 Hz, Lys-NH_ε), 6.91 (d, 1H, ³J=7.7 Hz, Lys-NH), 7.14 - 7.27 (m, 5H, 5·Ar. Phe-CH), 7.81 (d, 1H, ³J=8.5 Hz, Phe-NH), 7.94 (t, 1H, ³J=5.1 Hz, CH₂-CH₂-NH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH₄Ac): *m/z* (%) = 991.7 (100) [M+H⁺]⁺, 1013.7 (21) [M+Na⁺]⁺, 1029.7 (7) [M+K⁺]⁺. – R_f(EE) = 0.50. – C₅₀H₈₆N₈O₁₂ (991.26).



10-{2-[2-[2-(*tert*-Butylcarbonylamido)-1-succinoylamido]-2-methyl-acetylamido]-ethyl}-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (**311**)

Boc₃-Cyclen-EA-Ala-Boc-Asp(OBzl) (**301**) (0.319 mmol, 285 mg) wurde in 10 ml THF gelöst, mit einer Lösung aus LiOH·H₂O (0.430 mmol, 18 mg) in 10 ml THF/H₂O (6:4) versetzt und 24 h bei 60°C gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde die Reaktionslösung mit 25 ml ges. wässriger NH₄Cl-Lösung versetzt und 3 mal mit 40 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, das LM am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt im HV getrocknet.

Das Produkt **311** (0.317 mmol, 254 mg, 99%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. ¹H-NMR (300 MHz): δ = 1.11 - 1.52 (m, 39H, Ala-CH₃, 4·Boc-(CH₃)₃), 2.56 - 2.71 (m, 4H, 2-Cyclen-CH₂), 2.91 - 3.48 (m, 18H, 6-Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N, CH₂-CH₂-N, Asp-CH₂), 4.12 - 4.31 (m, 2H, Ala-H_α, Asp-H_α), 6.93 (d, 1H, ³J=8.5 Hz, Asp-NH), 7.83 (br, 1H, CH₂-CH₂-NH), 8.07 (d, 1H, ³J=7.1 Hz, Ala-NH), 12.54 (br, 1H, COOH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH₄Ac): *m/z* (%) = 702.6 (14) [M-Boc+H⁺]⁺, 802.6 (100) [M+H⁺]⁺. – MS (- p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH₄Ac): *m/z* (%) = 700.5 (6) [M-Boc-H⁺]⁻, 800.6 (100) [M-H⁺]⁻, 836.5 (8) [M+Cl]⁻. – C₃₇H₆₇N₇O₁₂ (801.97).

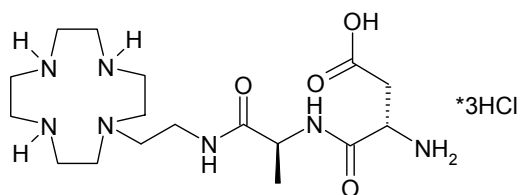


10-{2-[2-[2-(*tert*-Butylcarbonylamido)-1-succinoylamido]-2-benzyl-acetylamido]-ethyl}-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (**313**)

Boc₃-Cyclen-EA-Phe-Boc-Asp(OBzl) (**303**) (0.279 mmol, 270 mg) wurde in 10 ml THF gelöst, mit einer Lösung aus LiOH·H₂O (0.350 mmol, 15 mg) in 10 ml THF/H₂O (6:4) versetzt und 24 h bei 60°C gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde

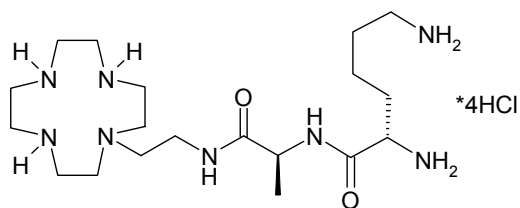
die Reaktionslösung mit 25 ml ges. wässriger NH_4Cl -Lösung versetzt und 3 mal mit 40 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das LM am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (LM = DCM/MeOH 9:1) gereinigt.

Das Produkt **303** (0.239 mmol, 210 mg, 86%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): δ = 1.30 - 1.47 (m, 36H, 4·Boc-(CH_3)₃), 2.54 - 2.67 (m, 4H, 2·Cyclen- CH_2), 2.70 - 3.02 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, 2·Phe- H_β), 3.05 - 3.67 (m, 18H, 6·Cyclen- CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, 2·Asp- H_β), 4.15 - 4.25 (m, 1H, Asp- H_α), 4.34 - 4.45 (m, 1H, Phe- H_α), 6.87 (d, 1H, $^3J=8.2$ Hz, Asp-NH), 7.15 - 7.28 (m, 5H, 5·Ar. Phe-CH), 7.91 (br, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 8.16 (d, 1H, $^3J=8.5$ Hz, Phe-NH), 12.55 (br, 1H, COOH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH_4Ac): m/z (%) = 878.6 (100) $[\text{M}+\text{H}^+]^+$, 900.6 (8) $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$. – MS (- p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH_4Ac): m/z (%) = 876.6 (100) $[\text{M}-\text{H}^-]$. – $\text{C}_{43}\text{H}_{71}\text{N}_7\text{O}_{12}$ (878.06).



1-{2-[2-(2-amino-1-succinoylamido)-2-methyl-acetylamido]-ethyl}-1,4,7,10-tetraacacyclododecan Hydrochlorid (**321**)

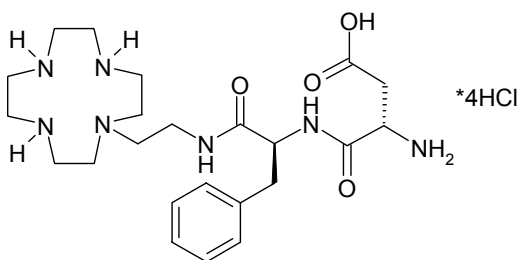
Unter N_2 -Atmosphäre wurden zu einer Lösung von Boc₃-Cyclen-EA-Ala-Boc-Asp (**311**) (0.319 mmol, 235 mg) in 3 ml abs. DCM und 3 ml abs. Diethylether bei RT 6 ml HCl ges. Diethylether zugetropft. Die Lösung begann sich nach 30 min zu trüben. Nach 24 h Rühren wurde das LM im Vakuum bei 30°C abgezogen. Der Rückstand wurde im HV getrocknet, in dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Das Produkt **321** (0.288 mmol, 147 mg, 98%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): δ = 1.22 (d, 3H, $^3J=7.1$ Hz, Ala- CH_3), 2.55 - 3.01 (m, 8H, 2·Cyclen- CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, Asp- CH_2), 3.08 - 3.56 (m, 14H, 6·Cyclen- CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 4.00 - 4.34 (m, 7H, Ala- H_α , Asp- H_α , 2·Cyclen- NH_2 , Cyclen-NH), 8.17 (br, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 8.37 (br, 3H, Asp- NH_3), 8.61 (d, 1H, $^3J=6.0$ Hz, Ala-NH), 13.60 (br, 1H, COOH). – MS (+ p ESI, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$): m/z (%) = 201.6 (29) $[\text{M}+2\text{H}^+]^{2+}$, 222.1 (100) $[\text{M}+2\text{H}^++\text{MeCN}]^{2+}$, 402.3 (15) $[\text{M}+\text{H}^+]^+$. – $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_4\cdot 3\text{HCl}$ (510.89).



1-{2-[2-(2,6-diamino-hexanoylamido)-2-methyl-acetylamido]-ethyl}-1,4,7,10-tetraacacyclododecan Hydrochlorid (322)

Unter N₂-Atmosphäre wurden zu einer Lösung von Boc₃-Cyclen-EA-Ala-Boc-Lys(Boc) (**302**) (0.233 mmol, 213 mg) in 7.9 ml abs. Diethylether bei RT 7.9 ml HCl ges. Diethylether zugetropft. Die Lösung begann sich nach 30 min zu trüben. Nach 24 h Rühren wurde das LM im Vakuum bei 30°C abgezogen. Der Rückstand wurde im HV getrocknet, in dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

Das Produkt **322** (0.230 mmol, 133 mg, 99%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. ¹H-NMR (300 MHz): δ = 1.26 (d, 3H, ³J=7.1 Hz, Ala-CH₃), 1.32 - 1.45 (m, 2H, 2·Lys-H_γ), 1.53 - 1.66 (m, 2H, 2·Lys-H_β), 1.69 - 1.81 (m, 2H, 2·Lys-H_δ), 2.54 - 2.65 (m, 2H, 2·Lys-H_ε), 2.69 - 3.62 (m, 20H, 8·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N, CH₂-CH₂-N), 3.74 - 3.86 (m, 1H, Lys-H_α), 4.02 - 4.32 (m, 6H, Ala-H_α, 2·Cyclen-NH₂, Cyclen-NH), 8.07 (br, 3H, 3·Lys-NH_ε), 8.35 (br, 4H, Lys-NH₃, CH₂-CH₂-NH), 8.86 (br, 1H, Ala-NH). – MS (+ p ESI, H₂O/MeCN): m/z (%) = 139.1 (8) [M+3H⁺]³⁺, 152.7 (41) [M+3H⁺+MeCN]³⁺, 166.4 (100) [M+3H⁺+2MeCN]³⁺, 180.1 (79) [M+3H⁺+3MeCN]³⁺, 208.1 (59) [M+2H⁺]²⁺, 228.6 (14) [M+2H⁺+MeCN]²⁺, 415.3 (24) [M+H⁺]⁺. – C₁₉H₄₂N₈O₂·4HCl·H₂O (578.45).



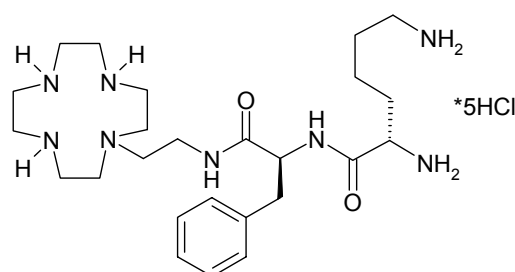
10-{2-[2-amino-1-succinoylamido]-2-benzyl-acetylamido]-ethyl}-1,4,7,10-tetraacacyclododecan Hydrochlorid (323)

Unter N₂-Atmosphäre wurden zu einer Lösung von Boc₃-Cyclen-EA-Phe-Boc-Asp (**313**) (0.144 mmol, 126 mg) in 3.9 ml abs. DCM bei RT 3.9 ml HCl ges. Diethylether zugetropft. Die Lösung begann sich nach 30 min zu trüben. Nach 24 h Rühren wurde das LM im Vakuum bei 30°C abgezogen. Der Rückstand

wurde im HV getrocknet, in dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

Das Produkt **323** (0.142 mmol, 96 mg, 99%) wurde als farbloser Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): δ = 2.54 - 3.55 (m, 24H, 8·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N, CH₂-CH₂-N, 2·Phe-H_β, 2·Asp-H_β), 3.72 - 4.24 (m, 7H, 3·Cyclen-NH₂, Asp-H_α), 4.37 - 4.50 (m, 1H, Phe-H_α), 7.15 - 7.34 (m, 5H, 5·Ar. Phe-CH), 8.16 - 8.45 (br, 4H, Phe-NH, Asp-NH₃), 8.74 (br, 1H, CH₂-CH₂-NH), 13.51 (br, 1H, COOH). – MS (+ p ESI, H₂O/MeCN): m/z (%) = 187.4 (12) [M+3H⁺+2MeCN]³⁺, 201.1 (24) [M+3H⁺+3MeCN]³⁺, 214.8 (15) [M+3H⁺+4MeCN]³⁺, 239.6 (30) [M+2H⁺]²⁺, 260.1 (100) [M+2H⁺+MeCN]²⁺, 478.3 (32) [M+H⁺]⁺. – C₂₃H₃₉N₇O₄·4HCl·3H₂O (677.49).

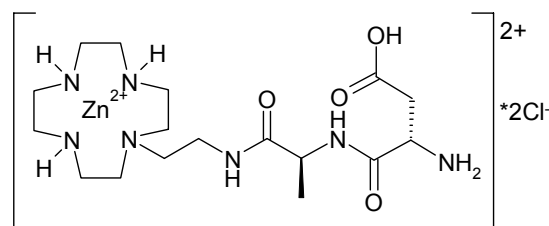


1-{2-[2-[2,6-diamino-hexanoylamido]-2-benzyl-acetylamido]-ethyl}-1,4,7,10-tetraacacyclododecan Hydrochlorid (**324**)

Unter N₂-Atmosphäre wurden zu einer Lösung von Boc₃-Cyclen-EA-Phe-Boc-Lys(Boc) (**304**) (0.242 mmol, 240 mg) in 8.1 ml abs. Diethylether bei RT 8.1 ml HCl ges. Diethylether zugetropft. Die Lösung begann sich nach 30 min zu trüben. Nach 24 h Rühren wurde das LM im Vakuum bei 30°C abgezogen. Der Rückstand wurde im HV getrocknet, in dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

Das Produkt **324** (0.240 mmol, 170 mg, 99%) wurde als farbloser Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): δ = 1.22 - 1.37 (m, 2H, 2·Lys-H_γ), 1.49 - 1.62 (m, 2H, 2·Lys-H_β), 1.65 - 1.81 (m, 2H, 2·Lys-H_δ), 2.54 - 2.63 (m, 2H, 2·Lys-H_ε), 2.66 - 3.62 (m, 22H, 8·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N, CH₂-CH₂-N, 2·Phe-H_β), 3.67 - 3.79 (m, 1H, Lys-H_α), 4.06 - 4.56 (m, 7H, 3·Cyclen-NH₂, Phe-H_α), 7.17 - 7.37 (m, 5H, 5·Ar. Phe-CH), 8.06 (br, 3H, 3·Lys-NH₂), 8.34 (br, 4H, Phe-NH, Lys-NH₃), 8.93 (br, 1H, CH₂-CH₂-NH). – MS (+ p ESI, H₂O/MeCN): m/z (%) = 164.4 (35) [M+3H⁺]³⁺, 178.1 (96) [M+3H⁺+MeCN]³⁺, 191.7 (100) [M+3H⁺+2MeCN]³⁺, 205.4 (85) [M+3H⁺+3MeCN]³⁺, 246.1 (84) [M+2H⁺]²⁺, 266.6 (11) [M+2H⁺+MeCN]²⁺, 491.4 (22) [M+H⁺]⁺. – C₂₅H₄₆N₈O₂·5HCl·2H₂O (709.02).

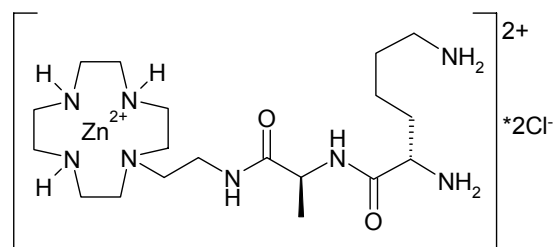


1-{2-[2-(2-amino-1-succinoylamido)-2-methyl-acetylamido]-ethyl}-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-Zn(II)-dichlorid (**331**)

Zu einer Lösung von Cyclen-EA-Ala-Asp-HCl (**321**) (0.284 mmol, 145 mg) in 3 ml MeOH wurden bei RT 720 µl 1 M wässrige NaOH-Lösung unter Rühren zugegeben. Anschließend wurde eine Lösung aus wasserfreiem ZnCl₂ (0.431 mmol, 59 mg) in 3 ml MeOH zugetropft und die Reaktionslösung 2 h bei RT und 16 h bei RF gerührt. Die Lösung wurde daraufhin so lange in der Siedehitze mit EtOH versetzt, bis sie sich leicht trübte. Anschließend wurde die Reaktionsmischung langsam abgekühlt und über Nacht bei -20°C gelagert. Der Niederschlag wurde über einen Büchnertrichter abgesaugt und mit -20°C kaltem EtOH gewaschen. Die ML wurde eingeeengt und in wenig MeOH/Wasser und EtOH umkristallisiert. Das vereinigte Produkt wurde im HV getrocknet.

Das Produkt **331** (0.223 mmol, 120 mg, 79%) wurde als farbloser Feststoff isoliert.

¹H-NMR (600 MHz): δ = 1.18 - 1.34 (m, 3H, Ala-CH₃), 2.62 - 2.90 (m, 19H, 8·Cyclen-CH₂, CH₂-CH₂-N, Asp-H_β), 3.24 - 3.31 (m, 3H, CH₂-CH₂-N, Asp-H_β), 3.74 - 3.84 (m, 1H, Asp-H_α), 4.15 - 4.26 (m, 2H, Ala-H_α, Cyclen-NH), 4.42 - 4.49 (m, 2H, 2·Cyclen-NH), 7.95 (br, 2H, Asp-NH₂), 8.52 (d, 1H, ³J=7.4 Hz, Ala-NH), 8.80 (br, 1H, CH₂-CH₂-NH), 13.33 (br, 1H, COOH). – ¹³C-NMR (800 MHz): δ = 16.97 (+, Ala-C_β, HSQC), 33.12 (-, CH₂-CH₂-N, HSQC), 37.75 (-, Asp-C_β, HSQC), 42.16 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 43.36 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 44.26 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 48.55 (+, Ala-C_α, HSQC), 49.08 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 51.39 (+, Asp-C_α, HSQC), 51.55 (-, CH₂-CH₂-NH, HSQC), 168.72 (C_{quart}, Asp-COOH, HMBC), 169.54 (C_{quart}, Asp-CO, HMBC), 172.12 (C_{quart}, Ala-CO, HMBC). – MS (+ p ESI, H₂O/MeCN): *m/z* (%) = 232.5 (69) [M-2Cl]²⁺, 253.0 (58) [M-2Cl+MeCN]²⁺, 464.2 (64) [M-2Cl-H⁺]⁺, 500.2 (26) [M-Cl]⁺. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3465, 3267, 3078, 2939, 2880, 1655, 1543, 1451, 1398, 1292, 1134, 1090, 1046, 967, 856, 544. – C₁₇H₃₅N₇O₄ZnCl₂ (537.80).

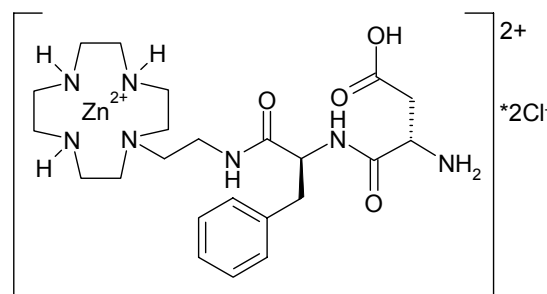


1-{2-[2-(2,6-diamino-hexanoylamido)-2-methyl-acetylamido]-ethyl}-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-Zn(II)-dichlorid (**332**)

Zu einer Lösung von Cyclen-EA-Ala-Lys-HCl (**322**) (0.075 mmol, 42 mg) in 1.5 ml MeOH wurden bei RT 260 μ l 1 M wässrige NaOH-Lösung unter Rühren zugegeben. Anschließend wurde eine Lösung aus wasserfreiem ZnCl_2 (0.112 mmol, 16 mg) in 2.5 ml MeOH zugetropft und die Reaktionslösung 1 h bei RT und 16 h bei RF gerührt. Die Lösung wurde daraufhin so lange in der Siedehitze mit EtOH versetzt, bis sie sich leicht trübte. Anschließend wurde die Reaktionsmischung langsam abgekühlt und über Nacht bei -20°C gelagert. Der Niederschlag wurde über einen Büchnertrichter abgesaugt und mit -20°C kaltem EtOH gewaschen. Die ML wurde eingeeengt und in wenig MeOH/Wasser und EtOH umkristallisiert. Das vereinigte Produkt wurde im HV getrocknet.

Das Produkt **332** (0.054 mmol, 30 mg, 75%) wurde als farbloser Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz): δ = 1.20 (d, 3H, $^3J=7.1$ Hz, Ala- CH_3), 1.29 - 1.35 (m, 2H, 2·Lys- H_γ), 1.41 - 1.61 (m, 4H, 2·Lys- H_β , 2·Lys- H_δ), 2.62 - 2.86 (m, 22H, 2·Lys- H_ϵ , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, 8·Cyclen- CH_2 , 2·Lys- NH_ϵ), 3.22 - 3.25 (m, 1H, Lys- H_α), 3.27 - 3.39 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, Lys- NH_2), 4.19 - 4.24 (m, 2H, Ala- H_α , Cyclen-NH), 4.42 - 4.46 (m, 2H, 2·Cyclen-NH), 8.05 (t, 1H, $^3J=5.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 8.13 (br, 1H, Ala-NH). – $^{13}\text{C-NMR}$ (800 MHz): δ = 18.35 (+, Ala- CH_3 , HSQC), 21.99 (-, Lys- C_γ , HSQC), 28.38 (-, Lys- C_δ , HSQC), 32.96 (-, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, HSQC), 33.66 (-, Lys- C_β , HSQC), 39.79 (-, Lys- C_ϵ , HSQC), 42.17 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 43.36 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 44.27 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 48.04 (+, Ala- C_α , HSQC), 48.91 (-, Cyclen- CH_2 , HSQC), 49.07 (-, Cyclen- CH_2 , HSQC), 51.47 (-, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, HSQC), 54.18 (+, Lys- C_α , HSQC), 172.19 (C_{quart} , Ala-CO, HMBC), 173.89 (C_{quart} , Lys-CO, HMBC). – MS (+ p ESI, $\text{H}_2\text{O/MeCN}$): m/z (%) = 159.8 (36) $[\text{M-2Cl}^-\text{+H}^+]^{3+}$, 173.4 (100) $[\text{M-2Cl}^-\text{+H}^+\text{+MeCN}]^{3+}$, 187.1 (49) $[\text{M-2Cl}^-\text{+H}^+\text{+2MeCN}]^{3+}$, 257.1 (42) $[\text{M-Cl}^-\text{+H}^+]^{2+}$. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3451, 3256, 2937, 2883, 1659, 1547, 1451, 1375, 1244, 1091, 1046, 980. – $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_2\text{ZnCl}_2$ (550.89).



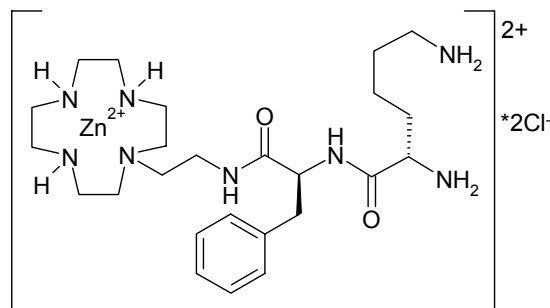
10-{2-[2-amino-1-succinoylamido]-2-benzyl-acetylamido]-ethyl}-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-Zn(II)-dichlorid (**333**)

Zu einer Lösung von Cyclen-EA-Phe-Asp-HCl (**323**) (0.139 mmol, 94 mg) in 2 ml MeOH wurden bei RT 570 μ l 1 M wässrige NaOH-Lösung unter Rühren zugegeben. Anschließend wurde eine Lösung aus wasserfreiem ZnCl_2 (0.245 mmol, 34 mg) in 2 ml MeOH zugetropft und die Reaktionslösung 2 h bei RT und 6 h bei RF gerührt. Die Lösung wurde daraufhin so lange in der Siedehitze mit EtOH versetzt, bis sie sich leicht trübte. Anschließend wurde die Reaktionsmischung langsam abgekühlt und über Nacht bei -20°C gelagert. Der Niederschlag wurde über einen Büchnertrichter abgesaugt und mit -20°C kaltem EtOH gewaschen. Die ML wurde eingeeengt und in wenig MeOH/Wasser und EtOH umkristallisiert. Das vereinigte Produkt wurde im HV getrocknet.

Das Produkt **333** (0.122 mmol, 75 mg, 88%) wurde als farbloser Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz): δ = 2.12 - 2.16 (m, 1H, Asp- H_β), 2.54 - 2.58 (m, 1H, Asp- H_β), 2.61 - 2.86 (m, 19H, 8·Cyclen- CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$, Phe- H_β), 3.26 (d, 1H, $^3J=13.3$ Hz, Phe- H_β), 3.29 - 3.36 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 3.52 - 3.57 (m, 1H, Asp- H_α), 4.14 (br, 1H, Cyclen-NH), 4.24 - 4.29 (m, 1H, Phe- H_α), 4.50 (br, 2H, 2·Cyclen-NH), 7.17 - 7.30 (m, 5H, 5·Ar. Phe-CH), 7.74 (br, 2H, Asp- NH_2), 8.64 (d, 1H, $^3J=5.8$ Hz, Phe-NH), 9.06 (br, 1H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$). – $^{13}\text{C-NMR}$ (800 MHz): δ = 34.17 (-, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$ HSQC), 36.07 (-, Phe- C_β , HSQC), 37.28 (-, Asp- C_β , HSQC), 42.23 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 43.34 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 44.29 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 49.27 (-, 2·Cyclen- CH_2 , HSQC), 51.22 (+, Asp- C_α , HSQC), 51.66 (-, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, HSQC), 54.88 (+, Phe- C_α , HSQC), 126.20 (-, Phe- C_ζ , HSQC, HMBC), 128.18 (-, 2·Phe- C_ϵ , HSQC, HMBC), 128.90 (-, 2·Phe- C_δ , HSQC, HMBC), 138.85 (C_{quart} , Phe- C_γ , HMBC), 169.61 (C_{quart} , Asp-CO, HMBC), 169.82 (C_{quart} , COOH, HMBC), 171.04 (C_{quart} , Phe-CO, HMBC). – MS (+ p ESI, $\text{H}_2\text{O/MeCN}$): m/z (%) = 270.6 (73) $[\text{M-2Cl}]^{2+}$, 540.3 (100) $[\text{M-2Cl-H}]^+$. – MS (- p ESI, $\text{H}_2\text{O/MeCN}$): m/z (%) = 612.3 (100) $[\text{M-H}]^+$, 689.5 (33) $[\text{M+Cl+MeCN}]^-$. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3451, 3258, 3065,

2935, 2882, 1659, 1547, 1452, 1296, 1091, 1047, 981, 856, 751, 704, 543. – $C_{23}H_{39}N_7O_4ZnCl_2$ (613.90).



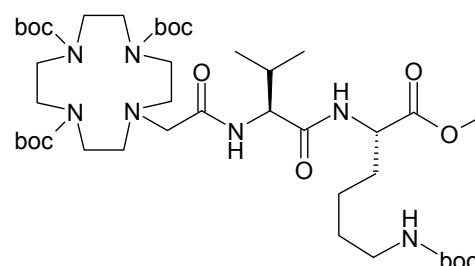
1-{2-[2-[2,6-diamino-hexanoylamido]-2-benzyl-acetylamido]-ethyl}-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-Zn(II)-dichlorid (334)

Cyclen-EA-Phe-Lys·HCl (**324**) (0.237 mmol, 168 mg) wurde in wenig Wasser gelöst und auf einen mit 200 ml Wasser gespülten Ionenaustauscher III (0.9 mmol/ml, 3.80 mmol, 4.2 ml) aufgetragen. Das Zwischenprodukt wurde mit ca. 120 ml Wasser, bis das Filtrat keine basische Reaktion mehr gegenüber einem pH-Papier zeigte, eluiert. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml eingengt und in 5 ml MeOH aufgenommen. Zu dieser Lösung wurde bei RT eine Lösung aus $ZnCl_2$ (0.380 mmol, 52 mg) in 5 ml MeOH unter Rühren getropft. Die entstandene Suspension wurde 2 h bei RT gerührt, auf RF erhitzt und über Nacht weiter gerührt. Nach dem Abkühlen auf $-20^\circ C$ wurde der Niederschlag über einen Büchnertrichter abgesaugt und mit kaltem EtOH gewaschen. Die ML wurde eingengt und in wenig MeOH/Wasser und EtOH umkristallisiert. Das vereinigte Produkt wurde im HV getrocknet.

Das Produkt **334** (0.070 mmol, 50 mg, 34%) wurde als farbloser Feststoff isoliert.

1H -NMR (600 MHz): δ = 1.06 - 1.12 (m, 2H, 2·Lys- H_γ), 1.29 - 1.44 (m, 4H, 2·Lys- H_β , 2·Lys- H_δ), 2.58 - 2.86 (m, 23H, 2·Lys- H_ϵ , $\underline{CH_2-CH_2-N}$, 8·Cyclen- CH_2 , Phe- H_β , 2·Lys- NH_ζ), 2.99 - 3.03 (m, 1H, Phe- H_β), 3.14 - 3.17 (m, 1H, Lys- H_α), 3.27 - 3.39 (m, 4H, $\underline{CH_2-CH_2-N}$, Lys- NH_2), 4.23 (br, 1H, Cyclen-NH), 4.42 - 4.47 (m, 3H, Phe- H_α , 2·Cyclen-NH), 7.18 - 7.23 (m, 3H, 2·Phe- H_δ , Phe- H_ζ), 7.28 (dd, 2H, $^3J_{\delta\epsilon}=7.5$ Hz, $^3J_{\epsilon\zeta}=7.5$ Hz, 2·Phe- H_ϵ), 8.03 (br, 1H, Phe-NH), 8.10 (t, 1H, $^3J=5.6$ Hz, $\underline{CH_2-CH_2-NH}$). – ^{13}C -NMR (800 MHz): δ = 21.90 (-, Lys- C_γ , HSQC), 28.33 (-, Lys- C_δ , HSQC), 32.96 (-, $\underline{CH_2-CH_2-N}$ HSQC), 33.70 (-, Lys- C_β , HSQC), 37.66

(-, Phe-C β , HSQC), 39.86 (-, Lys-C ϵ , HSQC), 42.17 (-, 2·Cyclen-CH $_2$, HSQC), 43.37 (-, 2·Cyclen-CH $_2$, HSQC), 44.26 (-, 2·Cyclen-CH $_2$, HSQC), 48.95 (-, 2·Cyclen-CH $_2$, HSQC), 51.32 (-, $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$, HSQC), 53.62 (+, Phe-C α , HSQC), 54.57 (+, Lys-C α , HSQC), 126.38 (-, Phe-C ζ , HSQC, HMBC), 128.14 (-, 2·Phe-C ϵ , HSQC, HMBC), 129.17 (-, 2·Phe-C δ , HSQC, HMBC), 137.57 (C $_{\text{quart}}$, Phe-C γ , HMBC), 170.97 (C $_{\text{quart}}$, Phe-CO, HMBC), 174.18 (C $_{\text{quart}}$, Lys-CO, HMBC). – MS (+ p ESI, H $_2$ O/MeCN): m/z (%) = 198.7 (100) [M-2Cl $^-$ +H $^+$ +MeCN] $^{3+}$, 212.4 (81) [M-2Cl $^-$ +H $^+$ +2MeCN] $^{3+}$, 226.0 (17) [M-2Cl $^-$ +H $^+$ +3MeCN] $^{3+}$, 277.1 (53) [M-2Cl $^-$] $^{2+}$, 295.1 (30) [M-Cl $^-$ +H $^+$] $^{2+}$, 589.4 (10) [M-Cl $^-$] $^+$. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm $^{-1}$] = 3448, 3251, 2936, 2882, 1659, 1533, 1454, 1358, 1284, 1090, 982, 856, 749, 704. – C $_{25}\text{H}_{46}\text{N}_8\text{O}_2\text{ZnCl}_2$ (626.98).

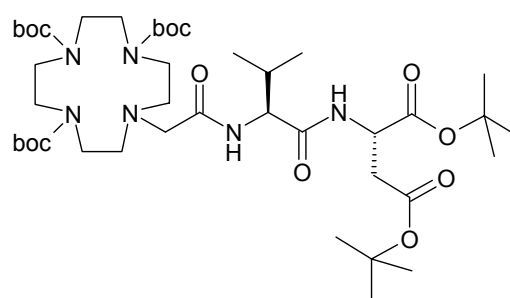


10-[2-(2-Acetylamido-3-methyl-butyrylamido)-6-*tert*-butylcarbonylamido-hexansäuremethylester]-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (401)

Unter N $_2$ -Atmosphäre wurden bei RT Boc $_3$ -Cyclen-Ac-Val-OH (**211**) (0.400 mmol, 252 mg), HOBt (0.440 mmol, 60 mg), DIEA (3.60 mmol, 0.62 ml) und HBTU (0.440 mmol, 167 mg) in wenig DMF gelöst und 5 min lang gerührt. L-Lys(Boc)-OMe-HCl (0.440 mmol, 131 mg) wurde, in wenig DMF gelöst, zugegeben und die Reaktionslösung 48 h bei RT weiter gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde die Lösung mit 40 ml wässrige NaHCO $_3$ -Lösung (50% ges.) versetzt und 3 mal mit 30 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend mit 2 mal 30 ml ges. wässriger NH $_4$ Cl-Lösung gewaschen, über Na $_2$ SO $_4$ getrocknet und das LM am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (LM = DCM/MeOH 9:1) gereinigt.

Das Produkt **401** (0.338 mmol, 295 mg, 85%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): δ = 0.79 - 0.90 (m, 6H, 2·Val-CH $_3$), 1.22 - 1.45 (m, 40H, 4·Boc-(CH $_3$) $_3$, 2·Lys-H $_\gamma$, 2·Lys-H $_\beta$), 1.55 - 1.71 (m, 2H, 2·Lys-H $_\delta$), 1.86 - 2.00

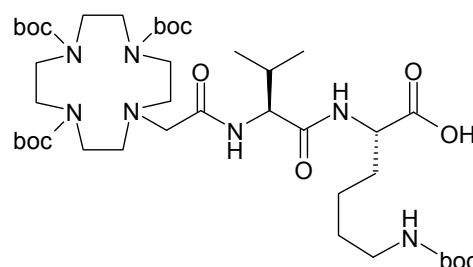
(m, 1H, Val-H_β), 2.60 - 2.70 (m, 2H, 2·Lys-H_ε), 2.76 - 2.92 (m, 4H, 2·Cyclen-CH₂), 3.10 - 3.50 (m, 14H, 6·Cyclen-CH₂, CH₂-CO), 3.61 (d, 3H, ³J=3.8 Hz, OCH₃), 4.10 - 4.35 (m, 2H, Lys-H_α, Val-H_α), 6.74 - 6.81 (m, 1H, Lys-NH_ε-Boc), 7.97 - 8.07 (m, 1H, Lys-NH), 8.35 - 8.46 (m, 1H, Val-NH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH₄Ac): *m/z* (%) = 872.7 (100) [M+H⁺]⁺, 894.6 (11) [M+Na⁺]⁺. – R_f(EE) = 0.46. – C₄₂H₇₇N₇O₁₂ (872.10).



10-[2-(2-Acetylamido-3-methyl-butrylamido)-succinsäure-di-*tert*-butylester]-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (402)

Unter N₂-Atmosphäre wurden bei RT Boc₃-Cyclen-Ac-Val-OH (**211**) (0.400 mmol, 252 mg), HOBT (0.440 mmol, 60 mg), DIEA (3.60 mmol, 0.62 ml) und HBTU (0.440 mmol, 167 mg) in wenig DMF gelöst und 5 min lang gerührt. L-Asp(O^tBu)-O^tBu·HCl (0.440 mmol, 124 mg) wurde, in wenig DMF gelöst, zugegeben und die Reaktionslösung 48 h bei RT weiter gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde die Lösung mit 30 ml wässrige NaHCO₃-Lösung (50% ges.) versetzt und 3 mal mit 50 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das LM am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (LM = EE/PE 9:1) gereinigt.

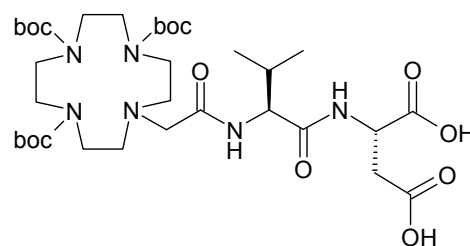
Das Produkt **401** (0.327 mmol, 280 mg, 82%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. ¹H-NMR (300 MHz): δ = 0.79 - 0.89 (m, 6H, 2·Val-CH₃), 1.32 - 1.45 (m, 45H, 5·Boc-(CH₃)₃), 1.86 - 1.97 (m, 1H, Val-H_β), 2.61 - 2.87 (m, 4H, 2·Cyclen-CH₂), 3.11 - 3.49 (m, 16H, 6·Cyclen-CH₂, CH₂-CO, 2·Asp-H_β), 4.20 - 4.29 (m, 1H, Val-H_α), 4.39 - 4.53 (m, 1H, Asp-H_α), 8.05 (d, 1H, ³J=9.0 Hz, Asp-NH), 8.38 - 8.47 (m, 1H, Val-NH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH₄Ac): *m/z* (%) = 857.6 (100) [M+H⁺]⁺, 879.6 (19) [M+Na⁺]⁺. – R_f(EE) = 0.72. – C₄₂H₇₆N₆O₁₂ (857.09).



10-[2-(2-Acetylamido-3-methyl-butrylamido)-6-*tert*-butylcarbonylamido-hexansäure]-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (411)

Boc₃-Cyclen-Ac-Val-Lys(Boc)-OMe (**401**) (0.328 mmol, 286 mg) wurde in 10 ml THF gelöst, mit einer Lösung aus LiOH·H₂O (0.394 mmol, 17 mg) in 10 ml THF/H₂O (6:4) versetzt und 12 h bei 60°C gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde das LM am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (LM = DCM/MeOH 9:1 → 3:1) gereinigt.

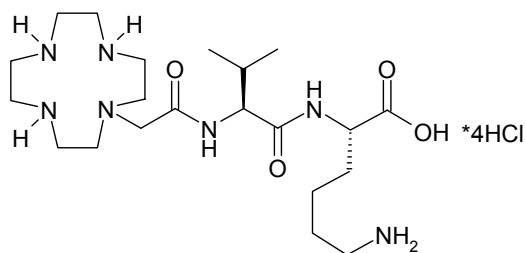
Das Produkt **411** (0.282 mmol, 242 mg, 86%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. ¹H-NMR (300 MHz): δ = 0.79 - 0.88 (m, 6H, 2·Val-CH₃), 1.14 - 1.44 (m, 40H, 4·Boc-(CH₃)₃, 2·Lys-H_γ, 2·Lys-H_β), 1.48 - 1.71 (m, 2H, 2·Lys-H_δ), 1.92 - 2.04 (m, 1H, Val-H_β), 2.62 - 2.72 (m, 2H, 2·Lys-H_ε), 2.78 - 2.90 (m, 4H, 2·Cyclen-CH₂), 3.14 - 3.49 (m, 14H, 6·Cyclen-CH₂, CH₂-CO), 3.84 - 3.98 (m, 1H, Lys-H_α), 4.08 - 4.27 (m, 1H, Val-H_α), 6.73 (t, 1H, ³J=5.5 Hz, Lys-NH_ζ-Boc), 7.74 (br, 1H, Lys-NH), 8.01 - 8.15 (m, 1H, Val-NH), 12.82 (br, 1H, COOH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH₄Ac): *m/z* (%) = 858.6 (100) [M+H⁺]⁺, 880.6 (6) [M+Na⁺]⁺. – R_f(DCM/MeOH 3:1) = 0.70. – C₄₁H₇₅N₇O₁₂ (858.07).



10-[2-(2-Acetylamido-3-methyl-butrylamido)-succinsäure]-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri-*tert*-butylester (412)

Boc₃-Cyclen-Ac-Val-Asp(O^{*t*}Bu)-O^{*t*}Bu (**402**) (0.324 mmol, 278 mg) wurde in 10 ml THF gelöst, mit einer Lösung aus LiOH·H₂O (0.814 mmol, 34 mg) in 10 ml THF/H₂O (6:4) versetzt und 12 h bei 60°C gerührt. Nach einer DC-Kontrolle wurde

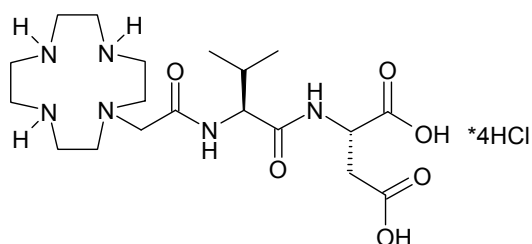
die Reaktionslösung mit 40 ml ges. wässriger NH_4Cl -Lösung versetzt, mit 0.1 M wässriger HCl -Lösung auf einen pH-Wert von 3 eingestellt und 3 mal mit 40 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das LM am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (LM = DCM/MeOH 9:1 \rightarrow 3:1) gereinigt. Das Produkt **412** (0.273 mmol, 203 mg, 84%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. ^1H -NMR (300 MHz): δ = 0.77 - 0.88 (m, 6H, 2·Val- CH_3), 1.36 (br, 18H, 2·Boc-(CH_3)₃), 1.39 (br, 9H, Boc-(CH_3)₃), 1.90 - 2.09 (m, 1H, Val- H_β), 2.61 - 2.88 (m, 4H, 2·Cyclen- CH_2), 3.12 - 3.53 (m, 16H, 6·Cyclen- CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CO}$, 2·Asp- H_β), 4.03 - 4.31 (m, 2H, Val- H_α , Asp- H_α), 7.66 - 7.87 (m, 1H, Asp-NH), 8.02 - 8.14 (m, 1H, Val-NH). – MS (+ p ESI, DCM/MeCN + 10 mM NH_4Ac): m/z (%) = 745.5 (100) $[\text{M}+\text{H}^+]^+$, 767.4 (10) $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$, 783.4 (9) $[\text{M}+\text{K}^+]^+$. – $\text{C}_{42}\text{H}_{76}\text{N}_6\text{O}_{12}$ (857.09).



1-[2-(2-Acetylamido-3-methyl-butyrylamido)-6-amino-hexansäure]-1,4,7,10-tetraacacyclododecan Hydrochlorid (**421**)

Unter N_2 -Atmosphäre wurden zu einer Lösung von Boc₃-Cyclen-Ac-Val-Lys(Boc)-OH (**411**) (0.270 mmol, 232 mg) in 7.2 ml abs. DCM bei RT langsam 7.2 ml HCl ges. Diethylether zugetropft. Die Lösung begann sich nach 30 min zu trüben. Nach 24 h Rühren wurde das LM im Vakuum bei 30°C abgezogen. Der Rückstand wurde im HV getrocknet, in dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

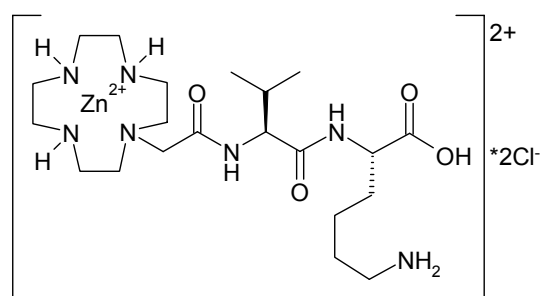
Das Produkt **421** (0.269 mmol, 177 mg, 99%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. ^1H -NMR (300 MHz): δ = 0.79 - 0.92 (m, 6H, 2·Val- CH_3), 1.28 - 1.43 (m, 2H, 2·Lys- H_γ), 1.50 - 1.75 (m, 4H, 2·Lys- H_β , 2·Lys- H_δ), 1.95 - 2.08 (m, 1H, Val- H_β), 2.66 - 2.79 (m, 2H, 2·Lys- H_ϵ), 2.90 - 3.62 (m, 18H, 8·Cyclen- CH_2 , $\text{CH}_2\text{-CO}$), 3.91 - 4.49 (m, 8H, 3·Cyclen- NH_2 , Lys- H_α , Val- H_α), 8.07 (br, 3H, Lys- NH_3), 8.25 - 8.40 (m, 2H, Lys-NH, Val-NH), 12.39 (br, 1H, COOH). – MS (+ p ESI, MeCN/ H_2O): m/z (%) = 229.6 (68) $[\text{M}+2\text{H}^+]^{2+}$, 250.1 (100) $[\text{M}+2\text{H}^++\text{MeCN}]^{2+}$, 458.3 (21) $[\text{M}+\text{H}^+]^+$. – $\text{C}_{21}\text{H}_{43}\text{N}_7\text{O}_4 \cdot 4\text{HCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (657.50).



1-[2-(2-Acetylamido-3-methyl-butirylamido)-succinsäure]-1,4,7,10-tetraacacyclododecan Hydrochlorid (422)

Unter N₂-Atmosphäre wurden zu einer Lösung von Boc₃-Cyclen-Ac-Val-Asp-OH (**412**) (0.269 mmol, 200 mg) in 5.4 ml abs. DCM bei RT langsam 5.4 ml HCl ges. Diethylether zugetropft. Die Lösung begann sich nach 30 min zu trüben. Nach 24 h Rühren wurde das LM im Vakuum bei 30°C abgezogen. Der Rückstand wurde im HV getrocknet, in dest. Wasser gelöst und gefriergetrocknet.

Das Produkt **422** (0.266 mmol, 162 mg, 99%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. ¹H-NMR (300 MHz): δ = 0.77 - 0.92 (m, 6H, 2·Val-CH₃), 1.91 - 2.07 (m, 1H, Val-H_β), 2.54 - 2.77 (m, 2H, 2·Asp-H_β), 2.83 - 3.59 (m, 18H, 8·Cyclen-CH₂, CH₂-CO), 3.72 - 4.44 (m, 7H, 3·Cyclen-NH₂, Val-H_α), 4.47 - 4.59 (m, 1H, Asp-H_α), 8.24 - 8.24 (m, 2H, Asp-NH, Val-NH), 10.34 (br, 1H, COOH), 12.62 (br, 1H, COOH). – MS (+ p ESI, MeCN/H₂O): *m/z* (%) = 243.5 (29) [M+2H⁺+MeCN]²⁺, 445.2 (100) [M+H⁺]⁺, 467.2 (8) [M+Na⁺]⁺. – C₁₉H₃₆N₆O₆·4HCl·H₂O (608.38).

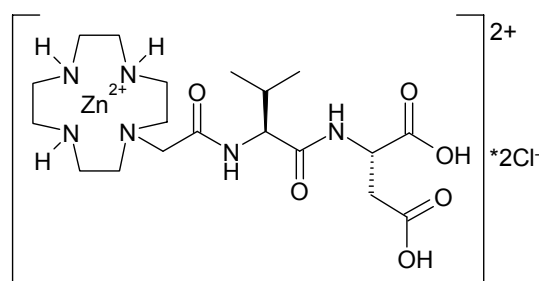


1-[2-(2-Acetylamido-3-methyl-butirylamido)-6-amino-hexansäure]-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-Zn(II)-dichlorid (431)

Zu einer Lösung von Cyclen-Ac-Val-Lys·HCl (**421**) (0.260 mmol, 171 mg) in 4 ml MeOH wurden bei RT 1.06 ml 1 M wässrige NaOH-Lösung unter Rühren zugegeben. Nach 5-minütigem Rühren wurde eine Lösung aus wasserfreiem ZnCl₂ (0.453 mmol, 62 mg) in 4 ml MeOH zugetropft und die Reaktionslösung 1 h bei RT und 12 h bei RF gerührt. Die Lösung wurde daraufhin so lange in der

Siedehitze mit EtOH versetzt, bis sie sich leicht trübte. Anschließend wurde die Reaktionsmischung langsam abgekühlt und über Nacht bei -20°C gelagert. Der Niederschlag wurde über einen Büchnertrichter abgesaugt und mit -20°C kaltem EtOH gewaschen. Die ML wurde eingeeengt und in wenig MeOH/Wasser und EtOH umkristallisiert. Das vereinigte Produkt wurde im HV getrocknet.

Das Produkt **431** (0.226 mmol, 134 mg, 87%) wurde als farbloser Feststoff isoliert. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz): δ = 0.79 - 1.03 (m, 6H, 2·Val-CH₃), 1.25 - 1.75 (m, 6H, 2·Lys-H_β, 2·Lys-H_γ, 2·Lys-H_δ), 1.80 - 2.05 (m, 1H, Val-H_β), 2.60 - 3.09 (m, 2H, 2·Lys-H_ε, 8·Cyclen-CH₂), 3.39 - 3.48 (m, 2H, CH₂-CO), 3.83 - 4.02 (m, 1H, Lys-H_α), 4.11 - 4.57 (m, 4H, 3·Cyclen-NH, Val-H_α), 7.73 (br, 2H, 2·Lys-NH_ζ), 8.30 (br, 1H, Lys-NH), 8.56 (br, 1H, Val-NH), 12.39 (br, 1H, COOH). – $^{13}\text{C-NMR}$ (800 MHz): δ = 17.96 (+, Val-CH₃, HSQC), 19.26 (+, Val-CH₃, HSQC), 22.77 (-, Lys-C_γ, HSQC), 27.84 (-, Lys-C_δ, HSQC), 30.22 (+, Val-C_β, HSQC), 33.08 (-, Lys-C_β, HSQC), 39.88 (-, Lys-C_ε, HSQC), 42.37 (-, Cyclen-CH₂, HSQC), 42.63 (-, Cyclen-CH₂, HSQC), 43.49 (-, Cyclen-CH₂, HSQC), 43.61 (-, Cyclen-CH₂, HSQC), 44.50 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 51.06 (-, 2·Cyclen-CH₂, HSQC), 52.80 (-, CH₂-CO, HSQC), 55.44 (+, Lys-C_α, HSQC), 56.58 (+, Val-C_α, HSQC), 168.36 (C_{quart}, 2·CO, HMBC), 174.54 (C_{quart}, COOH, HMBC). – MS (+ p ESI, H₂O/MeCN): m/z (%) = 187.6 (8) [M-2Cl⁻+H⁺+MeCN]³⁺, 201.3 (7) [M-2Cl⁻+H⁺+2MeCN]³⁺, 260.5 (100) [M-2Cl⁻]²⁺, 281.1 (32) [M-2Cl⁻+MeCN]²⁺, 520.3 (10) [M-2Cl⁻-H⁺]⁺. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3451, 3257, 3082, 2962, 2935, 2879, 1642, 1530, 1461, 1397, 1297, 1242, 1090, 1046, 963, 856, 741, 583. – C₂₁H₄₃N₇O₄ZnCl₂ (593.91).



1-[2-(2-Acetylamido-3-methyl-butyrylamido)-succinsäure]-1,4,7,10-tetraacacyclododecan-Zn(II)-dichlorid (**432**)

Zu einer Lösung von Cyclen-Ac-Val-Asp·HCl (**422**) (0.260 mmol, 158 mg) in 4 ml MeOH wurden bei RT 1.07 ml 1 M wässrige NaOH-Lösung unter Rühren

zugegeben. Nach 5-minütigem Rühren wurde eine Lösung aus wasserfreiem ZnCl_2 (0.458 mmol, 63 mg) in 4 ml MeOH zugetropft und die Reaktionslösung 1 h bei RT und 12 h bei RF gerührt. Die Lösung wurde daraufhin so lange in der Siedehitze mit EtOH versetzt, bis sie sich leicht trübte. Anschließend wurde die Reaktionsmischung langsam abgekühlt und über Nacht bei -20°C gelagert. Der Niederschlag wurde über einen Büchnertrichter abgesaugt und mit -20°C kaltem EtOH gewaschen. Die ML wurde eingeeengt und in wenig MeOH/Wasser und EtOH umkristallisiert. Das vereinigte Produkt wurde im HV getrocknet.

Das Produkt **432** (0.207 mmol, 120 mg, 80%) wurde als farbloser Feststoff isoliert.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): δ = 0.78 - 0.92 (m, 6H, 2·Val- CH_3), 2.09 - 2.15 (m, 1H, Val- H_β), 2.22 - 2.26 (dd, 1H, $^2J=15.6$ Hz, $^3J=3.7$ Hz, Asp- H_β), 2.61 - 3.01 (m, 15H, Asp- H_β , 7·Cyclen- CH_2), 3.05 - 3.10 (m, 1H, 0.5·Cyclen- CH_2), 3.25 - 3.30 (m, 1H, 0.5·Cyclen- CH_2), 3.36 - 3.40 (d, 1H, $^3J=16.6$ Hz, 0.5- $\text{CH}_2\text{-CO}$), 3.63 - 3.69 (d, 1H, $^3J=16.6$ Hz, 0.5- $\text{CH}_2\text{-CO}$), 4.18 (dd, 1H, $^3J_{\alpha\beta}=4.2$ Hz, $^3J_{\alpha,\text{NH}}=9.8$ Hz, Val- H_α), 4.28 (br, 1H, Cyclen-NH), 4.41 (br, 1H, Cyclen-NH), 4.45 (br, 1H, Cyclen-NH), 4.59 (dt, 1H, $^3J_{\alpha\beta}=3.9$ Hz, $^3J_{\alpha,\text{NH}}=9.8$ Hz, Asp- H_α), 7.90 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\alpha}=9.8$ Hz, Asp-NH), 8.92 (d, 1H, $^3J_{\text{NH},\alpha}=9.8$ Hz, Val-NH), 10.70 (br, 1H, COOH), 12.07 (br, 1H, COOH). – $^{13}\text{C-NMR}$ (800 MHz): δ = 17.10 (+, Val- CH_3 , HSQC), 19.30 (+, Val- CH_3 , HSQC), 29.90 (+, Val- C_β , HSQC), 41.75 (-, Asp- C_β , HSQC), 42.22 (-, Cyclen- CH_2 , HSQC), 42.45 (-, Cyclen- CH_2 , HSQC), 43.28 (-, Cyclen- CH_2 , HSQC), 43.54 (-, Cyclen- CH_2 , HSQC), 44.25 (-, Cyclen- CH_2 , HSQC), 44.40 (-, Cyclen- CH_2 , HSQC), 48.80 (+, Asp- C_α , HSQC), 49.16 (-, Cyclen- CH_2 , HSQC), 50.13 (-, Cyclen- CH_2 , HSQC), 53.12 (-, $\underline{\text{CH}_2\text{-CO}}$, HSQC), 57.30 (+, Val- C_α , HSQC), 169.00 (C_{quart} , $\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{CO}}$, HMBC), 169.45 (C_{quart} , Val-CO, HMBC), 175.09 (C_{quart} , Asp-COOH, HMBC), 175.50 (C_{quart} , Asp- $\text{C}_\gamma\text{OOH}$, HMBC). – MS (+ p ESI, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$): m/z (%) = 507.3 (100) $[\text{M}-2\text{Cl}^--\text{H}^+]^+$. – MS (- p ESI, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$): m/z (%) = 541.3 (100) $[\text{M}-\text{Cl}^-+2\text{H}^+]^+$, 565.3 (7) $[\text{M}-2\text{Cl}^-+2\text{H}^++\text{CH}_3\text{COO}^-]$, 579.2 (7) $[\text{M}-\text{H}^+]$. – IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3489, 3429, 3262, 3075, 2930, 2878, 1670, 1624, 1570, 1446, 1410, 1385, 1294, 1241, 1090, 964, 575. – $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_6\text{ZnCl}_2$ (580.82).

4 Ergebnisse

4.1 Expression von isotopenmarkierten Proteinen

Um Proteine mittels heteronuklearer, zweidimensionaler NMR-Spektroskopie untersuchen zu können, müssen diese mit ^{13}C oder ^{15}N isotopenmarkiert werden, da die natürliche Häufigkeit, sowie die Empfindlichkeit dieser NMR-aktiven Kerne sehr gering ist. Für die Markierung von verkürztem H-Ras(wt)-GppNHp wurde zunächst ein Expressionstest in unmarkiertem Neidhardt-Medium durchgeführt. Dazu wurden eine Vorkultur mit 25 ml Volumen bei einer Temperatur von 37°C und einer Schüttlergeschwindigkeit von 220 rpm innerhalb von 25 h hergestellt. Mit je 1 ml dieser Vorkultur ($\text{OD}_{600} = 2.30$) wurden anschließend 12 Proben a 20 ml Neidhardt-Medium beimpft. 6 dieser Proben wurden bei einer Temperatur von 30°C und einer Schüttlergeschwindigkeit von 220 rpm, die übrigen 6 Proben bei einer Temperatur von 37°C und einer Schüttlergeschwindigkeit von 220 rpm inkubiert. Nach 4.5 h, 5.25 h und 6.5 h Inkubationszeit wurde die optische Dichte von jeweils zwei 37°C - bzw. 30°C -Proben gemessen (**Tab. 4.1.1**). Bei je einer 37°C - bzw. 30°C -Probe wurde die Proteinexpression mit 0.2 mM IPTG, bei der anderen mit 0.8 mM IPTG induziert. Nach weiteren 15 h Inkubationszeit wurde bei allen Proben die Hälfte des jeweiligen Volumens entnommen und der OD_{600} -Wert gemessen. Diese Zellkulturen wurden bei 13000 rpm zentrifugiert und die Pellets bei -20°C eingefroren. Weitere 3 h bis 5 h später wurde die optische Dichte der verbliebenen Proben vermessen, die Proben bei 13000 rpm zentrifugiert und die erhaltenen Pellets bei -20°C eingefroren.

Für den Aufschluss wurden die Zellpellets mit 200 μl Aufnahmepuffer (siehe Kapitel 2.2) gespült und in 100 μl Aufnahmepuffer resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden jeweils 10 μl einer Lösung bestehend aus 5 mg Lysozym in 240 μl Aufnahmepuffer zugegeben und 20 min bei 5°C geschüttelt. Nach der Zugabe von 5 μl 6%iger Natrium-desoxycholat-Lösung in Wasser wurden die Proben weitere 20 min bei 5°C geschüttelt und anschließend für 1 min mit Ultraschall behandelt, um den Zellaufschluss zu vervollständigen. Nach 30-minütigem Zentrifugieren bei 4000 g wurden die Proben mittels SDS-PAGE untersucht.

| Experiment | Inkubationszeit | OD ₆₀₀ | C _{IPTG} | Temperatur | Expressionszeit |
|------------|-----------------|-------------------|-------------------|------------|-----------------|
| 1A | 4.5 h | 0.87 | 0.2 mM | 30°C | 15 h |
| 1B | 4.5 h | 0.87 | 0.2 mM | 30°C | 20 h |
| 2A | 4.5 h | 0.87 | 0.8 mM | 30°C | 15 h |
| 2B | 4.5 h | 0.87 | 0.8 mM | 30°C | 20 h |
| 3A | 4.5 h | 0.87 | 0.2 mM | 37°C | 15 h |
| 3B | 4.5 h | 0.87 | 0.2 mM | 37°C | 20 h |
| 4A | 4.5 h | 0.88 | 0.8 mM | 37°C | 15 h |
| 4B | 4.5 h | 0.88 | 0.8 mM | 37°C | 20 h |
| 5A | 5.25 h | 1.06 | 0.2 mM | 30°C | 15 h |
| 5B | 5.25 h | 1.06 | 0.2 mM | 30°C | 19 h |
| 6A | 5.25 h | 1.07 | 0.8 mM | 30°C | 15 h |
| 6B | 5.25 h | 1.07 | 0.8 mM | 30°C | 19 h |
| 7A | 5.25 h | 1.05 | 0.2 mM | 37°C | 15 h |
| 7B | 5.25 h | 1.05 | 0.2 mM | 37°C | 19 h |
| 8A | 5.25 h | 1.02 | 0.8 mM | 37°C | 15 h |
| 8B | 5.25 h | 1.02 | 0.8 mM | 37°C | 19 h |
| 9A | 6.5 h | 1.38 | 0.2 mM | 30°C | 15 h |
| 9B | 6.5 h | 1.38 | 0.2 mM | 30°C | 18 h |
| 10A | 6.5 h | 1.34 | 0.8 mM | 30°C | 15 h |
| 10B | 6.5 h | 1.34 | 0.8 mM | 30°C | 18 h |
| 11A | 6.5 h | 1.36 | 0.2 mM | 37°C | 15 h |
| 11B | 6.5 h | 1.36 | 0.2 mM | 37°C | 18 h |
| 12A | 6.5 h | 1.34 | 0.8 mM | 37°C | 15 h |
| 12B | 6.5 h | 1.34 | 0.8 mM | 37°C | 18 h |

Tab. 4.1.1: Parameter der Expressionstests zur Isotopenmarkierung mit ¹⁵N.

Dabei erzielten die Expressionstests mit einer Inkubationstemperatur von 30°C und einer IPTG-Konzentration von 0.2 mM die größten Ras-Proteinmengen, wobei die Dauer der Inkubation nach der IPTG-Zugabe keine wesentliche Rolle spielte. Bei einer optischen Dichte von über 1.0 vor der IPTG-Zugabe wurden die erzielten Proteinmengen wieder schlechter, was auch den Ergebnissen von Tucker *et al.* (1996) entspricht.

Die mittels des Expressionstests durchgeführte ¹⁵N-Markierung von Ras(wt) in Neidhardt-Medium (siehe Kapitel 3.1.2) ergab eine Proteinausbeute von lediglich 10 mg/l Medium. Daraufhin wurde das Medium für die ¹⁵N-Markierungen von Ras(T35A) auf NMM umgestellt und die Inkubationstemperatur auf 32°C erhöht. Dadurch konnte die Ausbeute auf 17 mg/l gesteigert werden.

4.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

4.2.1 Einführung

Zur Bestimmung von Bindungskonstanten wird in der Literatur oft die Fluoreszenzspektroskopie herangezogen (K.A. Connors 1987). Der große Vorteil gegenüber anderen Untersuchungsmethoden wie z.B. der ITC ist die hohe Empfindlichkeit. Dadurch sind nur geringe Probenmengen nötig, um auswertbare Ergebnisse zu erhalten. Der Nachteil der Methode ist jedoch, dass zum Einen keinerlei Informationen über die Art und die genaue Position der Bindung erhalten werden und zum Anderen zur Auswertung eine Änderung in der Fluoreszenzemission benötigt wird. Um nun die Fluoreszenzspektroskopie am Ras-Protein anwenden zu können, ist ein Fluoreszenzfarbstoff nötig, der die Struktur des Proteins nicht oder nur sehr gering ändert. Wie bei John *et al.* (1990), Sydor *et al.* (1998) und M. Spörner (2002) beschrieben, eignet sich hierfür die Markierung des Nukleotids mit einer Mant-Gruppe, da deren Einführung eine nur geringe strukturelle Änderung zur Folge hat.

Das Mant-Nukleotid kann bei 366 nm angeregt werden und emittiert im sichtbaren Bereich mit einem Emissionsmaximum bei etwa 440 nm. Dabei ändert sich die Fluoreszenzemission während der Bindung von Molekülen an den Ras-mGppNHp-Komplex in der Nähe des Mants. Aus der Änderung der Fluoreszenzfläche während der Titration kann mit Hilfe der in Kapitel 3.4.4 beschriebenen Gleichung **3.18** die Bindungskonstante einer 1:1 Bindung von Zn^{2+} -Cyclen an den Ras-Nukleotid-Komplex (Abnahme der Fluoreszenzemission) bestimmt werden.

Wegen der Eigenabsorption des Cu^{2+} -Cyclen bei etwa 600 nm sind die Fluoreszenzspektren, die bei hohen Konzentrationen aufgenommen wurden, nur schwer auswertbar. Besonders der Einfluss auf die Fluoreszenzemission kann dabei sehr groß sein. Um diesen Effekt genauer bestimmen zu können, wurden Absorptionmessungen an unterschiedlichen Cu^{2+} -Cyclen-Konzentrationen in Wasser bei 25°C durchgeführt (**Abb. 4.2.1**). Dabei ist zu erkennen, dass das Cu^{2+} -Cyclen bei der Extinktionswellenlänge von 366 nm, bei der das Mant-Nukleotid angeregt wird, nahezu kein Licht absorbiert.

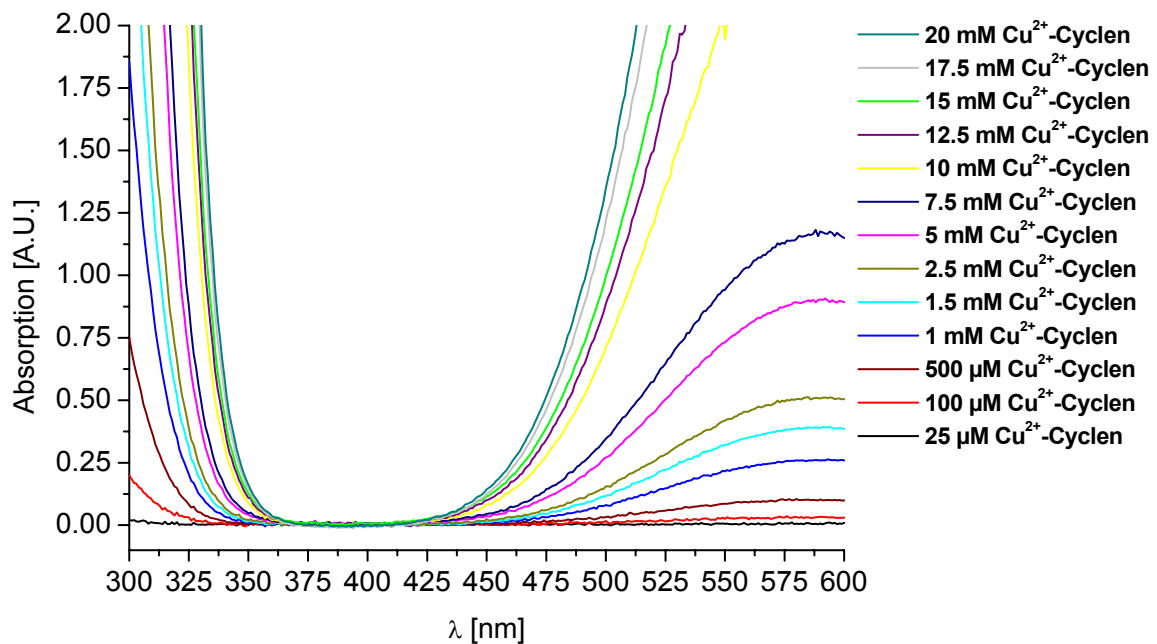


Abb. 4.2.1: Absorptionsspektren verschiedener Cu^{2+} -Cyclen-Konzentrationen in Wasser bei 25°C.

Im Gegensatz dazu steigt die Absorption von Cu^{2+} -Cyclen ab einer Wellenlänge von ca. 420 nm mit wachsender Konzentration an. Dies bedeutet, dass die Fluoreszenzemission im Bereich von ca. 365 nm bis 420 nm am geringsten von der Eigenabsorption des Cu^{2+} -Cyclens betroffen zu sein scheint. Aufgrund dieses Ergebnisses der Absorptionsmessungen wurde die Methode zur Auswertung der Titrationsdaten von Ras mit Cu^{2+} -Cyclen etwas abgewandelt. Zusätzlich zur Auswertung der Flächenänderung wurden die Änderungen der Fluoreszenzintensitäten zur Auswertung der Daten verwendet. Alle Ergebnisse dieser Fluoreszenzuntersuchungen sind am Ende des Kapitels in Tabelle 4.2.1 und 4.2.2 zusammengefasst.

4.2.2 Untersuchungen an Ras(T35A)

Aus Voruntersuchungen (Spoerner *et al.* 2005A) ist bekannt, dass Zn^{2+} -Cyclen ausschließlich an den Zustand 1 des Ras-Proteins im Komplex mit GppNHp bindet. Daher wurde zur Bestimmung der Bindungskonstanten von Zn^{2+} - und Cu^{2+} -Cyclen an Ras in diesem Zustand zunächst die T35A-Mutante ausgewählt, die nahezu vollständig in der Konformation des Zustands 1 vorliegt.

Die Titrationsexperimente wurden, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, mit Hilfe des Mant-markierten Nukleotids GppNHp in Messpuffer D bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Zur Veranschaulichung der Fluoreszenzänderungen bei der Zugabe von Cyclen zu Ras sind in Abbildung 4.2.2 die resultierenden Fluoreszenzspektren bei der Titration von Ras(T35A)·mGppNHp mit Cu^{2+} -Cyclen abgebildet.

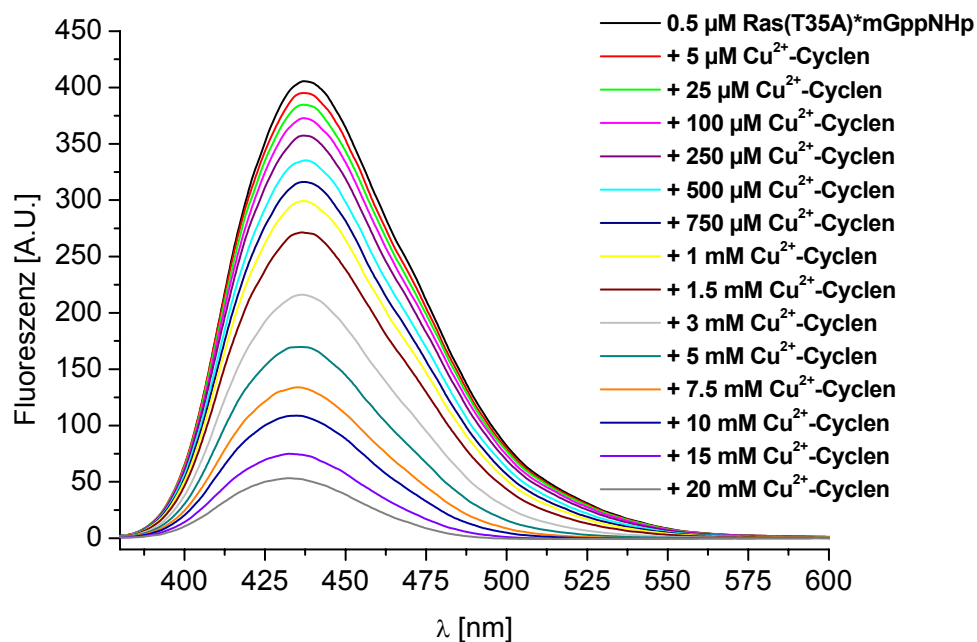


Abb. 4.2.2: Fluoreszenzspektren der Titration von 0.5 µM Ras(T35A)·mGppNHp mit Cu^{2+} -Cyclen in Messpuffer D bei 25°C. Die Extinktion erfolgte bei 366 nm.

Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, wurden die Änderungen in den Fluoreszenzintensitäten zur genaueren Bestimmung der Dissoziationskonstanten herangezogen. Zunächst wurde die Intensität gesucht, bei der die Eigenabsorption des Cu^{2+} -Cyclens den geringsten Einfluss auf die Auswertung besitzt. Dazu wurden die Intensitätsänderungen bei drei verschiedenen Wellenlängen untersucht und mit dem Ergebnis für die Flächenänderungen verglichen. Die Flächenänderungen

(A), sowie die Intensitätsänderungen bei 437 nm (B), 425 nm (C) und 400 nm (D) sind in Abbildung 4.2.3 gegen die jeweilige Konzentration an Cu^{2+} -Cyclen aufgetragen.

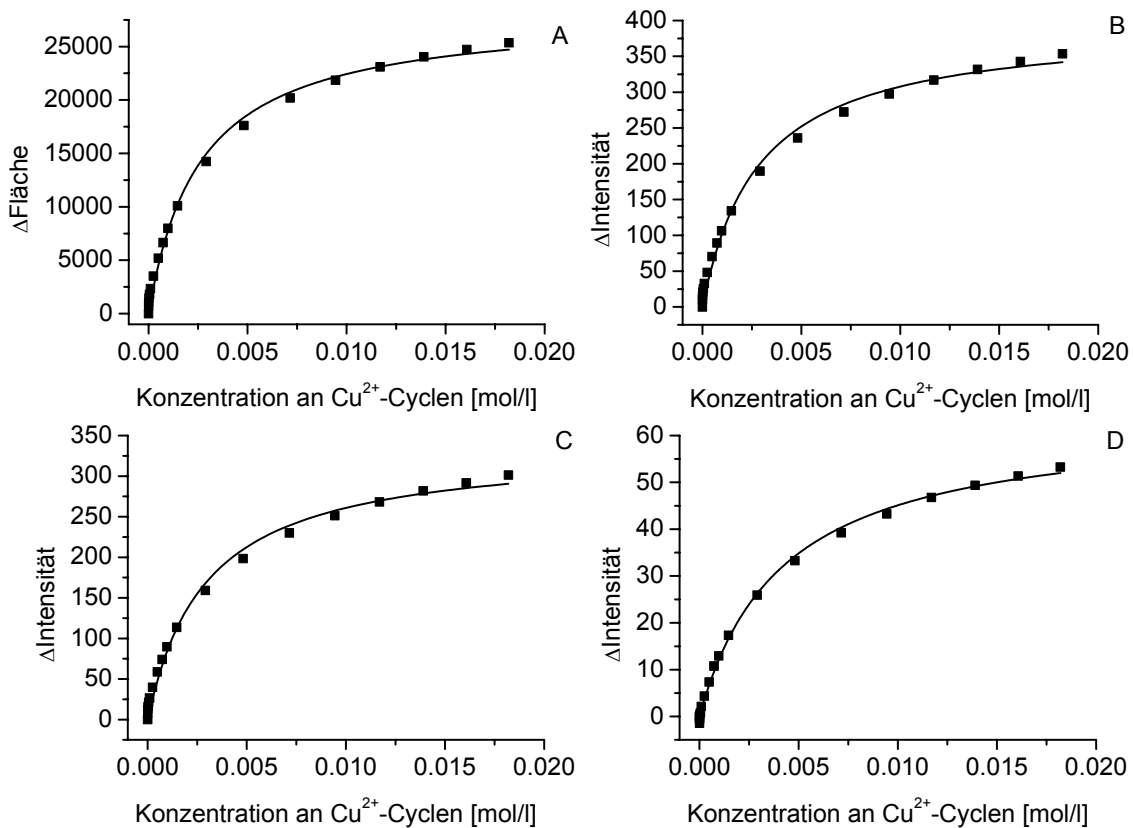


Abb. 4.2.3: Verlauf der Flächenänderungen (A) bzw. der Intensitätsänderungen (B-D) bei der Titration von Ras(T35A)·mGppNHp mit Cu^{2+} -Cyclen bei 25°C in Messpuffer D. A: Als Linie dargestellt ist die Anpassung der Gleichung 3.18 an die Flächenänderungen. Der erhaltene K_D -Wert beträgt 2.6 ± 0.2 mM. B: Als Linie dargestellt ist die Anpassung der Gleichung 3.19 an die Intensitätsänderungen bei 437 nm. Der erhaltene K_D -Wert beträgt 2.8 ± 0.3 mM. C: Als Linie dargestellt ist die Anpassung der Gleichung 3.19 an die Intensitätsänderungen bei 425 nm. Der erhaltene K_D -Wert beträgt 2.9 ± 0.3 mM. D: Als Linie dargestellt ist die Anpassung der Gleichung 3.19 an die Intensitätsänderungen bei 400 nm. Der erhaltene K_D -Wert beträgt 4.2 ± 0.2 mM.

Wie daraus zu erkennen ist, weist die Anpassung der Gleichung 3.19 an die Intensitätsänderungen bei einer Wellenlänge von 400 nm die geringste Abweichung zu den Daten auf. Dagegen ist die Anpassung der Gleichung 3.18 an die Fluoreszenzflächenänderungen wegen der Eigenabsorption des Cu^{2+} -Cyclens nur unter Inkaufnahme eines großen Fehlers in der Dissoziationskonstante durchführbar. Die mit Hilfe der unterschiedlichen Auswertung erhaltenen Dissoziationskonstanten sind für die Auswertung der Flächenänderungen und der

Intensitätsänderungen bei 437 nm und 425 nm im Rahmen des Auswertungsfehlers. Die K_D -Werte betragen 2.6 mM, 2.8 mM und 2.9 mM. Die geringe Abweichung dieser Ergebnisse voneinander kann mit dem Einfluss der Eigenabsorption des Cu(II)-Cyclens erklärt werden, der sich auch auf die Intensitätsänderungen bei 425 nm und 437 nm auszuwirken scheint. Im Gegensatz dazu weicht der Wert für die Dissoziationskonstante bei der Auswertung der Intensitätsänderungen bei 400 nm stark von den oben genannten Werten ab. Er beträgt hier 4.2 mM, was eine Abweichung von mehr als 60% vom Wert für die Flächenänderungen ergibt.

Aus diesem Grund wurden alle anderen Fluoreszenzdaten der Titration von Ras mit Cu²⁺-Cyclen unter Verwendung der Intensitätsänderungen bei 400 nm nach dem Modell einer 1:1 Bindung im schnellen Austausch ausgewertet.

Um auch die zu erwartende Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstante von Cu(II)-Cyclen zu überprüfen, wurde eine Messung bei 5°C durchgeführt, deren Verlauf zusammen mit der Messung bei 25°C in Abbildung 4.2.4 abgebildet ist.

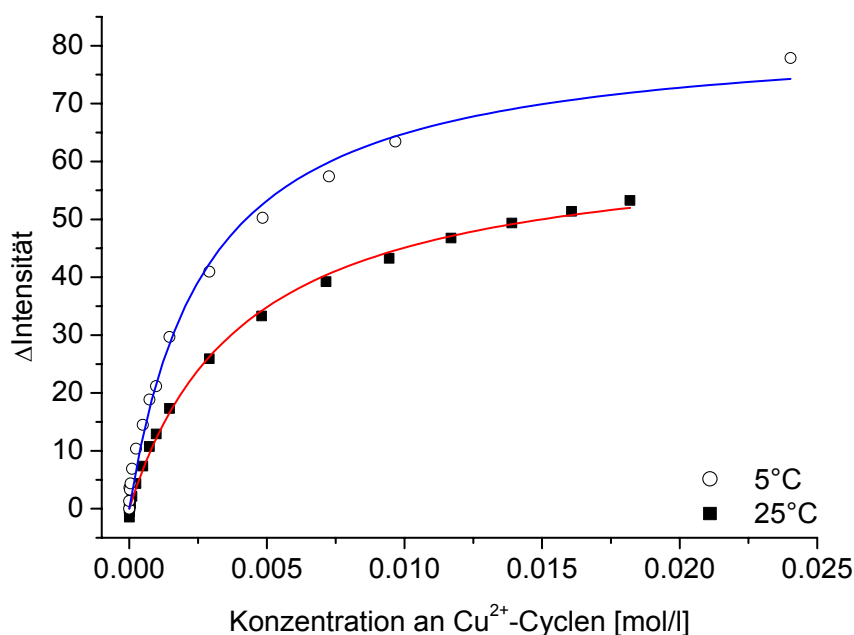


Abb. 4.2.4: Verlauf der Änderung der Fluoreszenzintensität bei der Titration von Ras(T35A)·mGppNHp mit Cu²⁺-Cyclen in Messpuffer D. In blau dargestellt ist die Anpassung der Gleichung 3.19 an die Datenpunkte bei 400 nm und 5°C. Der erhaltene K_D -Wert beträgt 2.8 ± 0.2 mM. In rot dargestellt ist die Anpassung der Gleichung 3.19 an die Datenpunkte bei 400 nm und 25°C. Der erhaltene K_D -Wert beträgt 4.2 ± 0.2 mM.

Die Dissoziationskonstanten für den Ras-Cyclen-Komplex liegen zwar mit 2.8 ± 0.2 mM für 5°C und 4.2 ± 0.2 mM für 25°C in der gleichen Größenordnung,

unterscheiden sich jedoch deutlich voneinander. Das bedeutet, dass die Temperatur einen deutlichen Einfluss auf die Bindungsaffinität von Cu^{2+} -Cyclen zum Ras(T35A) ausübt. Dies führt nach der Erniedrigung der Temperatur auf 5°C zu einer 1.5-fach höheren Bindungskonstante.

Zusätzlich zu den Untersuchungen an Cu^{2+} -Cyclen wurden auch Bindungsstudien von Ras(T35A) mit Zn^{2+} -Cyclen durchgeführt. Die mittels Gleichung 3.18 angepassten Flächenänderungen der Emissionsspektren ergaben für Zn^{2+} -Cyclen einen K_D -Wert von $0.17 \pm 0.02 \text{ mM}$ (**Abb. 4.2.5**). Im Vergleich dazu besitzt Cu^{2+} -Cyclen eine um etwa den Faktor 25 größere Dissoziationskonstante gleicher Temperatur.

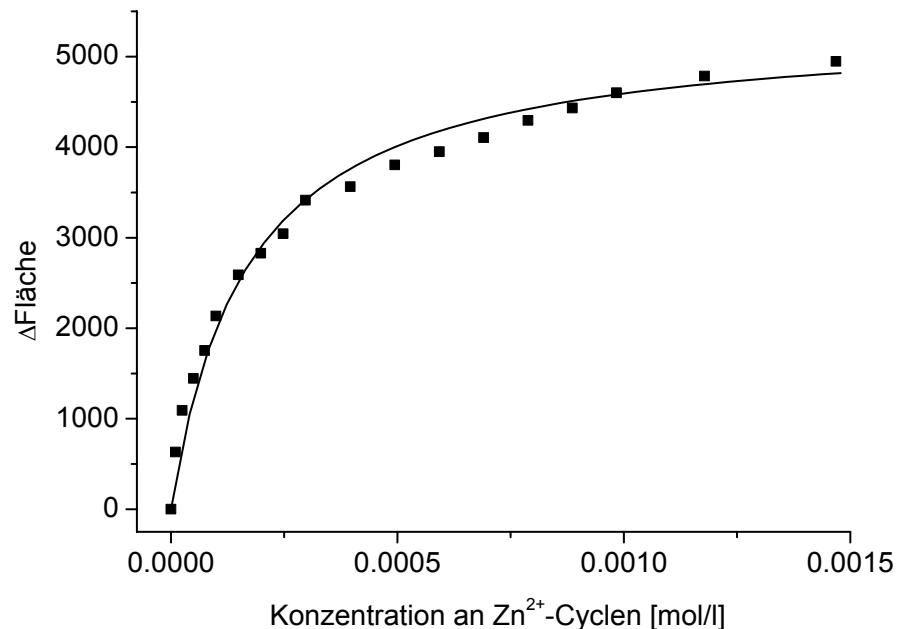


Abb. 4.2.5: Verlauf der Flächenänderung bei der Titration von $1 \mu\text{M}$ Ras(T35A)-mGppNHp mit Zn^{2+} -Cyclen in Messpuffer D bei 25°C . Als Linie dargestellt ist die Anpassung der Gleichung 3.18 an die Datenpunkte. Der erhaltene K_D -Wert beträgt $0.17 \pm 0.02 \text{ mM}$.

4.2.3 Untersuchungen an Ras(wt)·mGppNHp

Die Fluoreszenzspektroskopie wurde weiterhin verwendet, um die Affinität der Cyclenderivate zu Ras(wt)·mGppNHp zu untersuchen, das ebenso wie Ras(wt)·GppNHp in zwei Zuständen vorliegt (Spoerner *et al.* 2004). Diese Untersuchungen dienen zur Beurteilung des Einflusses der im thermischen Gleichgewicht stehenden konformationellen Zustände 1 und 2 des Ras-Proteins auf die Bindungsaffinität der Cyclenderivate. Dabei wurden ebenso, wie in Kapitel 4.2.2 aufgeführt, die beiden Cyclen-Metall-Komplexe mit Zn(II) und Cu(II) als Zentralionen herangezogen. Nach Auswertung des Titrationsexperiments nach Gleichung 3.18, ist eine Verschlechterung der Affinität von Zn²⁺-Cyclen zu Ras(wt) zu beobachten (**Abb. 4.2.6**), die etwa einen Faktor 4 im Vergleich zu Ras(T35A) ausmacht. Der K_D-Wert beträgt nur noch 0.61 ± 0.09 mM. Da Zn²⁺-Cyclen nicht an den Zustand 2 bindet, kann dieses Verhalten aufgrund der geringen Population des Zustands 1 im Ras(wt) erklärt werden.

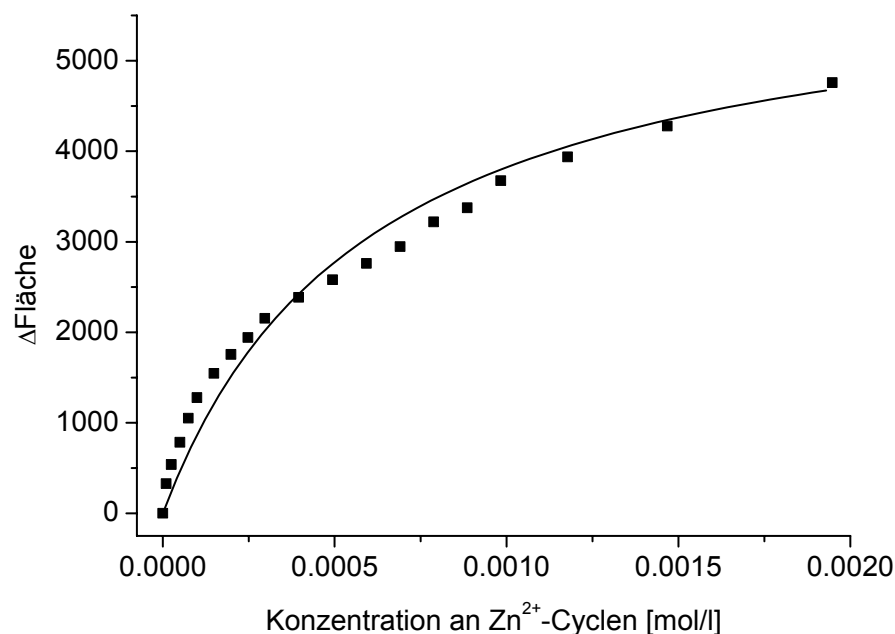


Abb. 4.2.6: Verlauf der Flächenänderung bei der Titration von 0.99 μ M Ras(wt)·mGppNHp mit Zn²⁺-Cyclen in Messpuffer D bei 25°C. Als Linie dargestellt ist die Anpassung der Gleichung 3.18 an die Datenpunkte. Der erhaltene K_D-Wert beträgt 0.61 ± 0.09 mM.

Im Gegensatz dazu verbessert sich anscheinend die Affinität von Cu²⁺-Cyclen zu Ras(wt). Dabei ergab die Anpassung von Gleichung 3.19 an die berechneten Intensitätsänderungen der Fluoreszenzsignale bei 400 nm eine Dissoziations-

konstante von 1.86 ± 0.08 mM (**Abb. 4.2.7**).

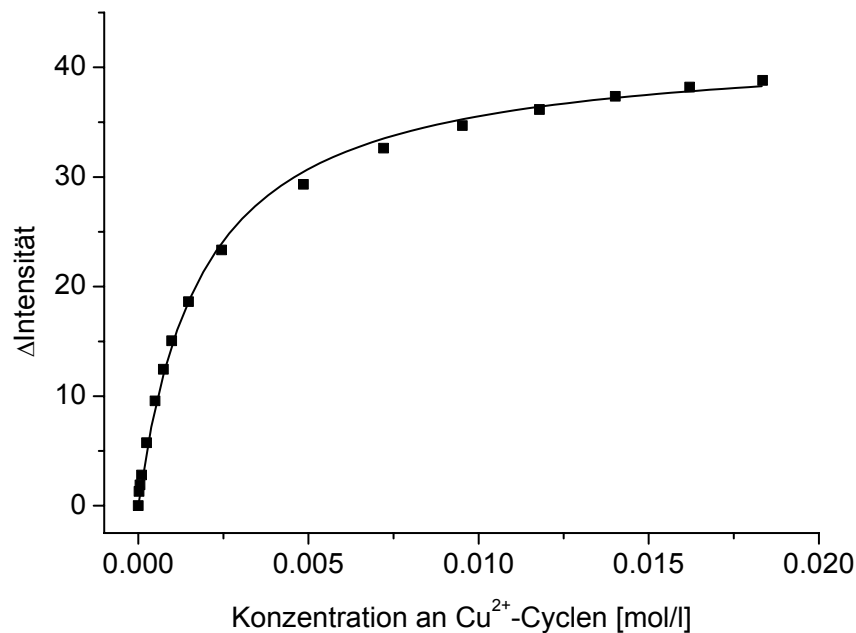


Abb. 4.2.7: Verlauf der Flächenänderung bei der Titration von $0.5 \mu\text{M}$ Ras(wt)·mGppNHp mit Cu^{2+} -Cyclen bei 25°C in Messpuffer D. Als Linie dargestellt ist Anpassung der Gleichung **3.19** an die Datenpunkte. Der erhaltene K_D -Wert beträgt 1.86 ± 0.08 mM.

Werden die Datenpunkte mit Hilfe der Gleichung **3.18** (für Flächenänderungen) angepasst, so beträgt der K_D -Wert 1.62 ± 0.07 mM. Die Abweichung zu der Auswertung nach Gleichung **3.19** (für Intensitätsänderungen) ist also deutlich geringer als bei der Untersuchung mit Ras(T35A)·mGppNHp. Im Vergleich zur Dissoziationskonstante des Ras(T35A)·mGppNHp- Cu^{2+} -Cyclen-Komplexes ist der K_D -Wert bei Ras(wt) etwa um den Faktor 2 kleiner. Die Dissoziationskonstante ist jedoch immer noch um den Faktor 3 größer, als die des Ras(wt)·mGppNHp- Zn^{2+} -Cyclen-Komplexes.

4.2.4 Untersuchungen an Ras(wt)·mGDP

Es wird vermutet, dass Ras(T35A) im Komplex mit GppNHp in einer „offenen“ Form vorliegt, ähnlich zu der im Komplex mit GDP. Da Zn^{2+} -Cyclen nur an die Konformation des Zustands 1 des Ras-Proteins im Komplex mit GppNHp bindet (Spoerner *et al.* 2005A), stellt sich die Frage, ob das Cyclen auch an Ras·GDP bindet. Die Untersuchung der Bindung der Cyclenkomplexe an Ras(wt)·mGDP kann daher zu einer teilweisen Charakterisierung der Bindungsstelle führen.

Nach Auswertung der Messdaten der Titration von Ras(wt)·mGDP mit Zn^{2+} -Cyclen nach Gleichung 3.18 ändert sich Affinität des Cyclens kaum. Der erhaltene K_D -Wert für diese Bindung beträgt 0.18 ± 0.02 mM (**Abb. 4.2.8**) und entspricht somit dem für die Bindung von Zn^{2+} -Cyclen an Ras(T35A)·mGppNHp von 0.17 ± 0.02 mM im Rahmen der Messgenauigkeit.

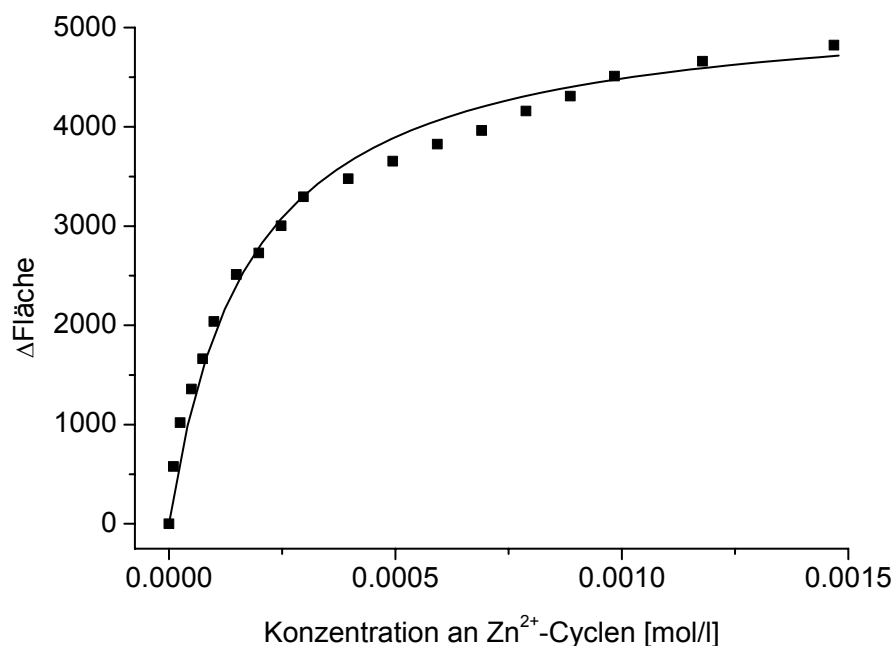


Abb. 4.2.8: Verlauf der Flächenänderung bei der Titration von $0.47 \mu\text{M}$ Ras(wt)·mGDP mit Zn^{2+} -Cyclen in Messpuffer D bei 25°C . Als Linie dargestellt ist die Anpassung der Gleichung 3.18 an die Datenpunkte. Der erhaltene K_D -Wert beträgt 0.18 ± 0.02 mM.

Durch eine Titration von Ras(wt)·mGDP mit Cu^{2+} -Cyclen (**Abb. 4.2.9**) kann diese Beobachtung annähernd bestätigt werden. Nach der Auswertung dieser Messdaten konnte eine Dissoziationskonstante von 3.0 ± 0.2 mM ermittelt werden.

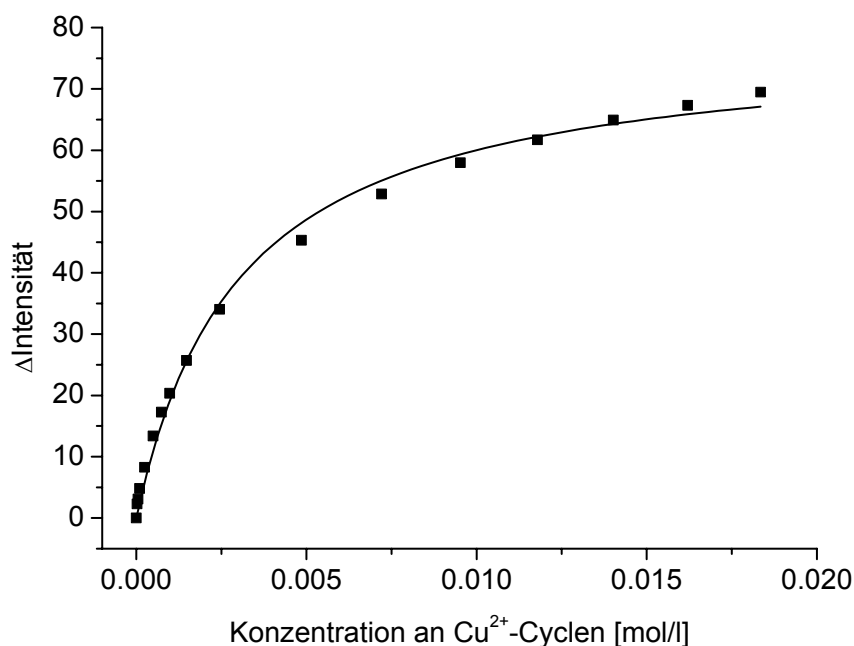


Abb. 4.2.9: Verlauf der Flächenänderung bei der Titration von 0.5 μM Ras(wt)-mGDP mit Cu^{2+} -Cyclen bei 25°C in Messpuffer D. Als Linie dargestellt ist die Anpassung der Gleichung 3.19 an die Datenpunkte. Der erhaltene K_D -Wert beträgt 3.0 ± 0.2 mM.

Im Rahmen der Messungenauigkeiten, wenn auch der Einfluss der Temperatur mit einbezogen wird, entspricht dieser K_D -Wert dem Ergebnis der Titration von Ras(T35A)-mGppNHp mit Cu^{2+} -Cyclen ($K_D = 4.2 \pm 0.2$ mM). Auch die Auswertung der Datenpunkte mit Gleichung 3.18 ergibt eine nahezu identische Dissoziationskonstante von 2.76 ± 0.03 mM für den Ras(wt)-mGDP- Cu^{2+} -Cyclen-Komplex. Dies bedeutet, dass der Einfluss der Eigenabsorption des Cu^{2+} -Cyclens doch geringer zu sein scheint, als ursprünglich angenommen. Alle Ergebnisse der Auswertung nach den Fluoreszenzflächen sind in Tabelle 4.2.1 aufgeführt.

| Ras-mGXP | M ²⁺ -Cyclen | T [°C] | c _{Ras} [$\mu\text{mol/l}$] | ΔA_c | K_D [mmol/l] |
|--------------|-------------------------|--------|--|------------------|-----------------|
| T35A-mGppNHp | Zn | 25 | 1.00 | 5370 ± 140 | 0.17 ± 0.02 |
| | Cu | 25 | 0.50 | 28227 ± 867 | 2.6 ± 0.3 |
| | | 5 | 0.53 | 41216 ± 1112 | 2.6 ± 0.2 |
| wt-mGppNHp | Zn | 25 | 0.99 | 6140 ± 367 | 0.61 ± 0.09 |
| | Cu | 25 | 0.50 | 23469 ± 223 | 1.62 ± 0.07 |
| wt-mGDP | Zn | 25 | 0.47 | 5287 ± 143 | 0.18 ± 0.02 |
| | Cu | 25 | 0.50 | 51675 ± 146 | 2.76 ± 0.03 |

Tab. 4.2.1: Ergebnisse der Fluoreszenztitrations zur Bestimmung der Bindungskonstanten von Zn^{2+} - und Cu^{2+} -Cyclen an Ras(wt) mit mGDP und mGppNHp als Nukleotid und Ras(T35A)-mGppNHp. Die Cu^{2+} -Cyclen-Daten wurden mittels Gleichung 3.18 ausgewertet. Alle angegebenen Fehler beziehen sich auf die Anpassungsfehler.

Die Ergebnisse der Auswertung nach den Fluoreszenzintensitäten sind gesondert in Tabelle 4.2.2 zusammengefasst.

| Ras·mGXP | T [°C] | c _{Ras} [μmol/l] | λ [nm] | ΔI _c [nm] | K _D [mmol/l] |
|--------------|--------|---------------------------|--------|----------------------|-------------------------|
| T35A·mGppNHp | 25 | 0.50 | 437 | 395 ± 11 | 2.8 ± 0.3 |
| | | | 425 | 337 ± 9 | 2.9 ± 0.3 |
| | | | 400 | 64 ± 1 | 4.2 ± 0.2 |
| | 5 | 0.53 | 400 | 83 ± 2 | 2.8 ± 0.2 |
| wt·mGppNHp | 25 | 0.50 | 400 | 42.2 ± 0.4 | 1.86 ± 0.08 |
| wt·mGDP | 25 | 0.50 | 400 | 78 ± 2 | 3.0 ± 0.2 |

Tab. 4.2.2: Ergebnisse der Fluoreszenztitrations zur Bestimmung der Bindungskonstanten von Cu²⁺-Cyclen an Ras(wt) mit mGDP und mGppNHp als Nukleotid und Ras(T35A)·mGppNHp. Die Intensitätsänderungen wurden mittels Gleichung 3.19 ausgewertet. Alle angegebenen Fehler beziehen sich auf die Anpassungsfehler.

4.3 NMR-Spektroskopische Untersuchungen

4.3.1 Untersuchung der Bindung von Cu^{2+} -Cyclen an Ras(wt)-GppNHp und ausgewählte Mutanten mit Hilfe der ^{31}P -NMR-Spektroskopie

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, bindet Zn^{2+} -Cyclen an den konformationellen Zustand 1 des Ras-Proteins und ist dadurch in der Lage, das konformationelle Gleichgewicht der beiden Zustände zum Zustand 1 hin zu verschieben (Spoerner *et al.* 2005A). Die Struktur der Konformation dieses Zustands 1 ist bisher für das humane Ras-Protein noch nicht vollständig aufgeklärt. Mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie kann zwischen den beiden Zuständen des Ras-Proteins unterschieden werden (Geyer *et al.* 1996). Darüber hinaus können damit auch Änderungen in den Populationsverhältnissen analysiert werden. Mit Hilfe des paramagnetischen Cu^{2+} -Cyclens ist es möglich, mehr Informationen über Bindungsstellen am Ras-Protein zu erhalten, da das zentrale Cu(II)-Ion über ein einzelnes ungepaartes Elektron verfügt, das die Relaxationszeiten von nahen, NMR-aktiven Kernen durch Spinrelaxation verkürzen kann. Dieser Effekt führt zu einer Verbreiterung des Resonanzsignals mit einer einhergehenden Abnahme der Signalintensität des betroffenen Kernels.

In Abbildung 4.3.1A ist das ^{31}P -NMR-Spektrum von Ras(wt)-GppNHp abgebildet, das in Lösung in den zwei Zuständen ($K_{12} = [2]/[1] = 2.0$) vorliegt. Die Resonanzlinien mit den chemischen Verschiebungen bei -2.59 ppm und -11.2 ppm können dem γ - bzw. α -Phosphat des gebundenen Nukleotids zugeordnet werden (Spoerner *et al.* 2004, Spoerner *et al.* 2005B), wenn sich Ras-Protein in der Konformation des Zustands 1 befindet. Demzufolge repräsentieren die Signale bei -3.31 ppm bzw. -11.77 ppm die Phosphatgruppen des Protein-Nukleotid-Komplexes im Zustand 2. Die Resonanzen des β -Phosphats bei -0.21 ppm liegen im verwendeten Magnetfeld nicht aufgespalten vor. In Anwesenheit von Cu^{2+} -Cyclen sind die ^{31}P -Resonanzen, die dem β - bzw. γ -Phosphat im Zustand 1 zuzuordnen sind, Tieffeld-verschoben, wohingegen das Signal des α -Phosphats Hochfeld-verschoben vorliegt (**Abb. 4.3.1**).

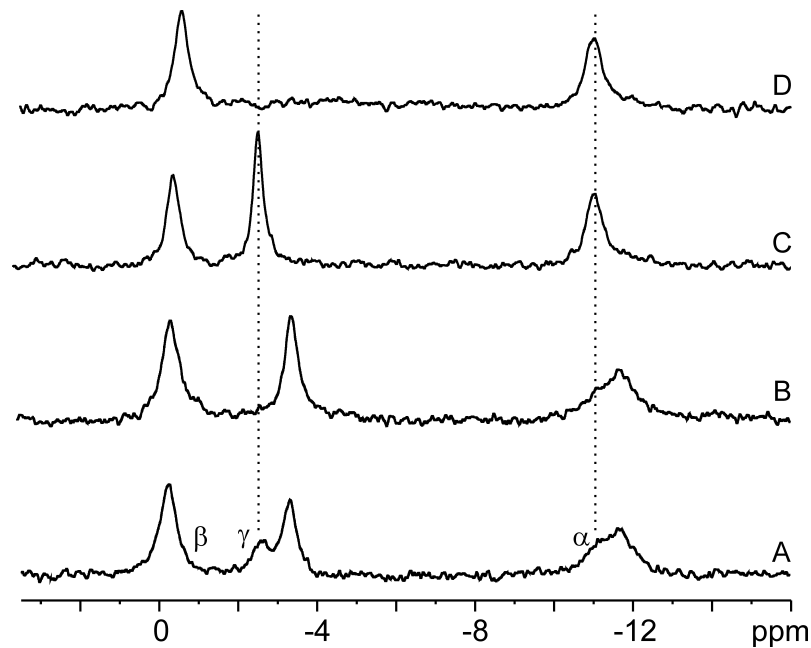


Abb. 4.3.1: Der Einfluss von Cu^{2+} -Cyclen auf ^{31}P -NMR-Spektren von Ras. ^{31}P -NMR-Spektrum von Ras-GppNHp in Messpuffer A mit 2 mM DSS und 5% D_2O . (A) 1.3 mM Ras(wt), (B) 1.3 mM Ras(wt) in Gegenwart von 2.6 mM Cu^{2+} -Cyclen, (C) 1.3 mM Ras(T35A) und (D) 1.3 mM Ras(T35A) in Gegenwart von 6.5 mM Cu^{2+} -Cyclen. Mit gestrichelten Linien sind die Signale gekennzeichnet, die dem konformationellen Zustand 1 zuzuweisen sind. Alle Spektren wurden bei 278K aufgenommen, die resultierenden FIDs mit einer Exponentialfunktion gefiltert und mit einer Linienbreite 15 Hz prozessiert.

Alle Resonanzlinien, die dem Zustand 1 zugeordnet werden können, sind durch die Zugabe von Cu^{2+} -Cyclen verbreitert. Dieser Effekt, der auf die Nähe des paramagnetischen $\text{Cu}(\text{II})$ -Ions hinweist, ist beim Signal des γ -Phosphats am stärksten ausgeprägt, das neben der sehr starken Verbreiterung noch verschoben ist. Nachdem Cu^{2+} -Cyclen an das Protein gebunden hat, verschwindet daher das Signal des γ -Phosphats im Rauschen. Die Resonanzlinien des Zustands 2 sind von den Effekten des Cu^{2+} -Cyclens nicht betroffen und sind daher weder verschoben noch verbreitert. Um zu überprüfen, ob das Resonanzsignal des γ -Phosphats, das dem Protein-Nukleotid-Komplex in der Konformation des Zustands 1 entspricht, in den Wildtyp-Spektren nicht einfach in das γ -Phosphat Signal des Zustands 2 übergeht oder von diesem überlagert wird, wurden Experimente an Ras(T35A)-GppNHp durchgeführt. Ras(T35A) ist eine Mutante, die vorzugsweise in der Konformation des Zustands 1 vorliegt ($K_{12} < 0.1$, Signale des Zustands 2 gehen im Rauschen der Basislinie unter), wenn GppNHp gebunden ist. Daher können die Effekte, wenn Cu^{2+} -Cyclen bindet, leichter beobachtet werden, da keine überlagernden Signale des Zustands 2 im Spektrum

zu finden sind. Der Einfluss des Cu^{2+} -Cyclens ist, ebenso wie beim Wildtyp-Ras besonders am γ -Phosphat Signal bei -2.52 ppm zu sehen, das wiederum deutlich stärker verbreitert wird, als das Signal des α - (-11.04 ppm) bzw. β -Phosphats (-0.36 ppm).

Weitere Bindungsexperimente wurden in Zusammenarbeit mit M. Spörner (Universität Regensburg) an den Ras-Mutanten Y32F, V29G und der onkogenen Ras-Mutante G12V (**Abb. 4.3.2**) durchgeführt.

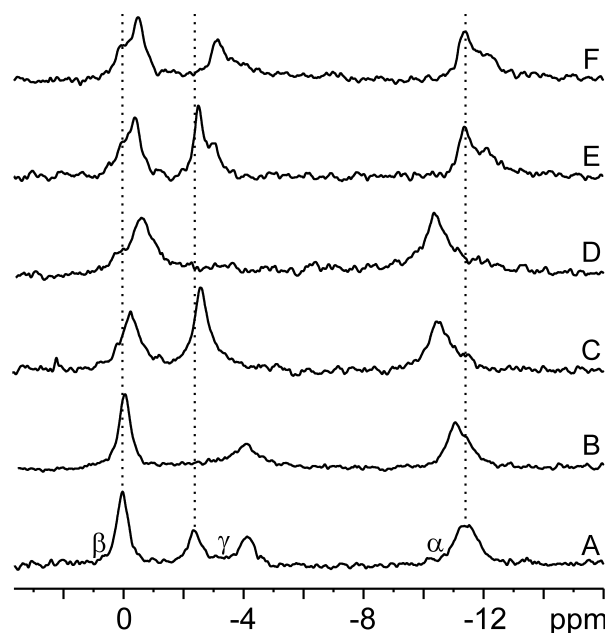


Abb. 4.3.2: Der Einfluss von Cu^{2+} -Cyclen auf ^{31}P -NMR-Spektren von verschiedenen Ras-Mutanten. ^{31}P -NMR-Spektrum von Ras-GppNHp in Messpuffer A mit 2 mM DSS und 5% D_2O . (A) 1.3 mM Ras(G12V), (B) 1.3 mM Ras(G12V) in Gegenwart von 39 mM Cu^{2+} -Cyclen, (C) 1.3 mM Ras(V29G), (D) 1.3 mM Ras(V29G) in Gegenwart von 6.5 mM Cu^{2+} -Cyclen, (E) 0.7 mM Ras(Y32F) und (F) 0.7 mM Ras(Y32F) in Gegenwart von 7 mM Cu^{2+} -Cyclen. Mit gestrichelten Linien sind die Signale gekennzeichnet, die dem konformationellen Zustand 1 zuzuweisen sind. Alle Spektren wurden bei 278K aufgenommen, die resultierenden FIDs mit einer Exponentialfunktion gefiltert und mit einer Linienbreite 15 Hz prozessiert.

Diese Mutanten wurden wegen ihrer unterschiedlichen Populationsverhältnisse der beiden Zustände (Spoerner et al. 2004) ausgewählt. Außerdem kann durch die Einführung von Mutationen in der Nähe einer vermutlichen Bindungsstelle der Einfluss dieser Mutation auf das Bindungsverhalten untersucht werden. Während die Y32F-Mutante in der GppNHp gebundenen Form teilweise in der Konformation des Zustands 2 vorliegt ($K_{12} = 0.6$), kommt Ras(V29G)·GppNHp, wie Ras(T35A), hauptsächlich im Zustand 1 vor ($K_{12} < 0.1$, Signale des Zustands 2 gehen im

Rauschen der Basislinie unter). Bei der onkogenen G12V-Mutante liegen die beiden Zustände nahezu gleich populierte im ^{31}P -NMR-Spektrum vor ($K_{12} = 0.9$). Nach der Zugabe von großen Mengen an Cu^{2+} -Cyclen weisen die ^{31}P -NMR-Spektren aller Mutanten das gleiche Verhalten auf, das schon bei Ras(wt) und Ras(T35A) beschrieben wurde. Hier werden ebenfalls nur die Signale, die dem Zustand 1 zuzuordnen sind, vom Effekt des Cu(II)-Ions betroffen, wohingegen die Signale des Zustands 2 keine Änderungen aufweisen. Die Werte für die chemischen Verschiebungen sind in Tabelle 4.3.1 zusammengefasst.

| Ras-GppNHp-Komplex | K_{12} | Ratio | chemische Verschiebung δ [ppm] | | | | | |
|----------------------------|----------|-------|---------------------------------------|----------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| | | | $\alpha^{(1)}$ | $\alpha^{(2)}$ | $\beta^{(1)}$ | $\beta^{(2)}$ | $\gamma^{(1)}$ | $\gamma^{(2)}$ |
| Ras(wt) (1.3 mM) | 2.0 | | (-11.2) | -11.77 | | -0.21 | -2.59 | -3.31 |
| + Cu^{2+} -Cyclen | | 1:2 | (-11.0) | -11.66 | | -0.28 | verbr. | -3.34 |
| Ras(T35A) (1.3 mM) | <0.1 | | -11.04 | | -0.36 | | -2.52 | |
| + Cu^{2+} -Cyclen | | 1:5 | -11.03 | | -0.57 | | verbr. | |
| Ras(V29G) (1.3 mM) | <0.1 | | -10.55 | | -0.25 | | -2.61 | |
| + Cu^{2+} -Cyclen | | 1:5 | -10.44 | | -0.62 | | verbr. | |
| Ras(Y32F) (0.7 mM) | 0.6 | | -11.40 | -12.16 | -0.40 | (0.0) | -2.50 | -3.00 |
| + Cu^{2+} -Cyclen | | 1:10 | -11.38 | -12.06 | -0.49 | (0.1) | (-3.8) | -3.14 |
| Ras(G12V) (1.3 mM) | 0.9 | | (-11.3) | (-11.6) | | 0.02 | -2.39 | -4.12 |
| + Cu^{2+} -Cyclen | | 1:30 | (-11.0) | (-11.4) | | -0.05 | verbr. | -4.10 |

Tab. 4.3.1: ^{31}P chemische Verschiebungen und konformationelle Zustände von Ras und Ras-Mutanten im Komplex mit GppNHp in Abwesenheit und in Gegenwart von Cu^{2+} -Cyclen. Den ^{31}P -NMR-Spektren wurden Lorentzfunktionen mit mehreren Signalen angepasst. Der geschätzte Fehler in den chemischen Verschiebungen liegt bei ± 0.05 ppm, wo hingegen die Werte in Klammern nicht genau genug errechnet werden konnten. Die Gleichgewichtskonstanten zwischen den beiden Zuständen $K_{12} = [2]/[1]$ wurden aus den einzelnen Integralen der ^{31}P -Resonanzen des γ -Phosphats berechnet.

4.3.2 Untersuchung der Bindung von Cu^{2+} -Cyclen an $\text{Ras(wt)}\cdot\text{GDP}$ und $\text{Ras(T35A)}\cdot\text{GTP}$

Für den Zustand 1 wird angenommen, dass das Ras-Protein in einer „offenen“ Struktur ähnlich zu der GDP-gebundenen Konformation vorliegt. Deswegen wurde die Auswirkung von Cu^{2+} -Cyclen auch auf $\text{Ras(wt)}\cdot\text{GDP}$ getestet. Dabei konnte im Rahmen der Messgenauigkeit kein Effekt beobachtet werden. Weder kam es zu einer Linienverbreiterung bei einem der beiden Phosphatsignale, noch waren Änderungen in deren chemischen Verschiebungen festzustellen (**Abb. 4.3.3A** und **Abb. 4.3.3B**).

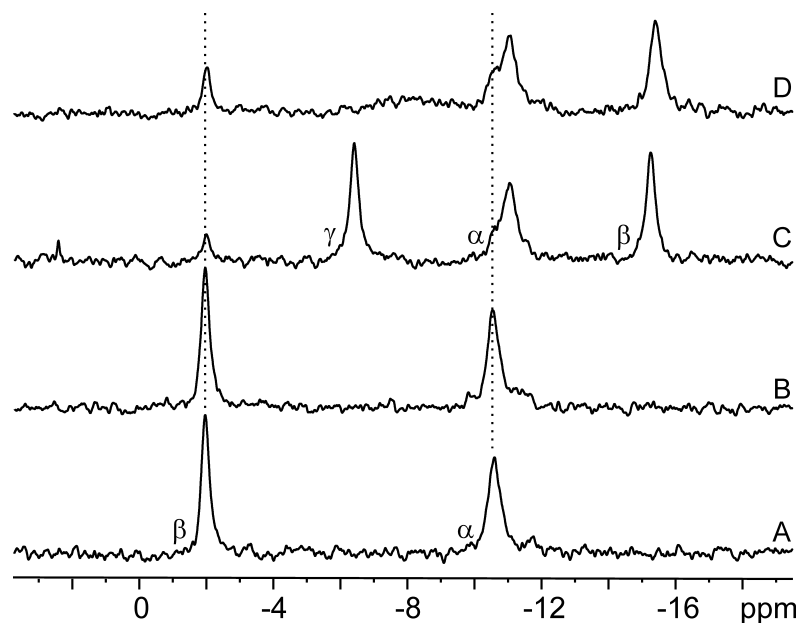


Abb. 4.3.3: Der Einfluss von Cu^{2+} -Cyclen auf ^{31}P -NMR-Spektren von $\text{Ras}\cdot\text{GXP}$ in Messpuffer A mit 2 mM DSS und 5% D_2O . (A) 1.3 mM $\text{Ras(wt)}\cdot\text{GDP}$, (B) 1.3 mM $\text{Ras(wt)}\cdot\text{GDP}$ in Gegenwart von 3.9 mM Cu^{2+} -Cyclen, (C) 1.3 mM $\text{Ras(T35A)}\cdot\text{GTP}$ und (D) 1.3 mM $\text{Ras(T35A)}\cdot\text{GTP}$ in Gegenwart von 6.5 mM Cu^{2+} -Cyclen. Mit gestrichelten Linien sind die Signale gekennzeichnet, die dem GDP zuzuweisen sind. Alle Spektren wurden bei 278K aufgenommen, die resultierenden FIDs mit einer Exponentialfunktion gefiltert und mit einer Linienbreite 15 Hz prozessiert.

Um auch die Bindung von Cu^{2+} -Cyclen an das aktive GTP-gebundene Ras zu verifizieren, und damit ausschließen zu können, dass die Bindung an den Protein-Nukleotid-Komplex einzig von der „Amidbindung“ im GppNHp abhängt, wurden zusätzlich Bindungsexperimente an $\text{Ras(T35A)}\cdot\text{GTP}$ durchgeführt. Für die Untersuchung der aktiven GTP-Form wurde wiederum die T35A-Mutante von Ras gewählt, da deren ^{31}P -NMR-Spektren, aufgrund der fehlenden Resonanzsignale

des Zustands 2, leichter zu interpretieren sind. Die Zuordnung der einzelnen Phosphatsignale im ^{31}P -NMR-Spektrum (**Abb. 4.3.3C** und **Abb. 4.3.3D**) wurden in Zusammenarbeit mit M. Spörner (Universität Regensburg, Manuskript in Vorbereitung) erstellt. Nach einer Zugabe von 5 Äquivalenten an Cu^{2+} -Cyclen zum Protein ist eine sehr starke Verbreiterung mit einer zusätzlichen Verschiebung des γ -Phosphatsignals zu beobachten. Diese Verbreiterung ist in schwächerer Form ebenfalls beim Signal des β -Phosphats und noch schwächer bei dem des α -Phosphats ausgeprägt. Zudem ist das Signal des β -Phosphats leicht Hochfeldverschoben. Die chemischen Verschiebungen für die Titrations von $\text{Ras}(\text{wt})\cdot\text{GDP}$ und $\text{Ras}(\text{T35A})\cdot\text{GTP}$ mit Cu^{2+} -Cyclen sind in Tabelle 4.3.2 zusammengefasst.

| Ras-Komplex | Ratio | chemische Verschiebung δ [ppm] | | |
|----------------------------|-------|---------------------------------------|---------|----------|
| | | α | β | γ |
| Ras(wt)·GDP (1.3 mM) | | -10.59 | -1.96 | - |
| + Cu^{2+} -Cyclen | 1:3 | -10.55 | -1.96 | - |
| Ras(T35A)·GTP (1.3 mM) | | -11.03 | -15.27 | -6.42 |
| + Cu^{2+} -Cyclen | 1:5 | -11.06 | -15.42 | (-8.2) |

Tab. 4.3.2: ^{31}P chemische Verschiebungen Ras·GXP in Abwesenheit und in Gegenwart von Cu^{2+} -Cyclen. Den ^{31}P -NMR-Spektren wurden Lorentzfunktionen mit mehreren Signalen angepasst. Der geschätzte Fehler in den chemischen Verschiebungen liegt bei ± 0.05 ppm, wo hingegen der Wert in Klammern nicht genau genug errechnet werden konnte, da das Signal durch das paramagnetische $\text{Cu}(\text{II})$ -Ion stark verbreitert wurde.

4.3.3 Bestimmung des Abstands des Cu(II)-Ions zu den einzelnen Phosphorkernen des Nukleotids

4.3.3.1 Berechnung der Bindungskonstante

Um den Abstand zwischen dem Cu(II)-Ion des Cu²⁺-Cyclens und den einzelnen Phosphorkernen des Nukleotids berechnen zu können, wurden zunächst Titrationsexperimente mit Ras(T35A)·GppNHp durchgeführt, das vollständig im Zustand 1 vorliegt. Aus den daraus gewonnenen NMR-Daten konnte mit Hilfe von Gleichung **3.15** (Kapitel 3.4.4) die Bindungskonstante für das Cu²⁺-Cyclen an Ras(T35A) berechnet werden, wenn eine 1:1 Bindung im schnellen Austausch vorausgesetzt wird. Hierfür wurden zunächst alle ³¹P-NMR-Spektren mittels einer Lorentzfunktion mit drei Signallinien angeglichen, um die entsprechenden chemischen Verschiebungen für die einzelnen Titrationsschritte zu erhalten. Die Änderungen dieser chemischen Verschiebungen aller drei Phosphorkerne wurden anschließend gegen die jeweilige Konzentration an Cu²⁺-Cyclen aufgetragen und den erhaltenen Datenpunkten gleichzeitig drei Funktionen angepasst (**Abb. 4.3.4**).

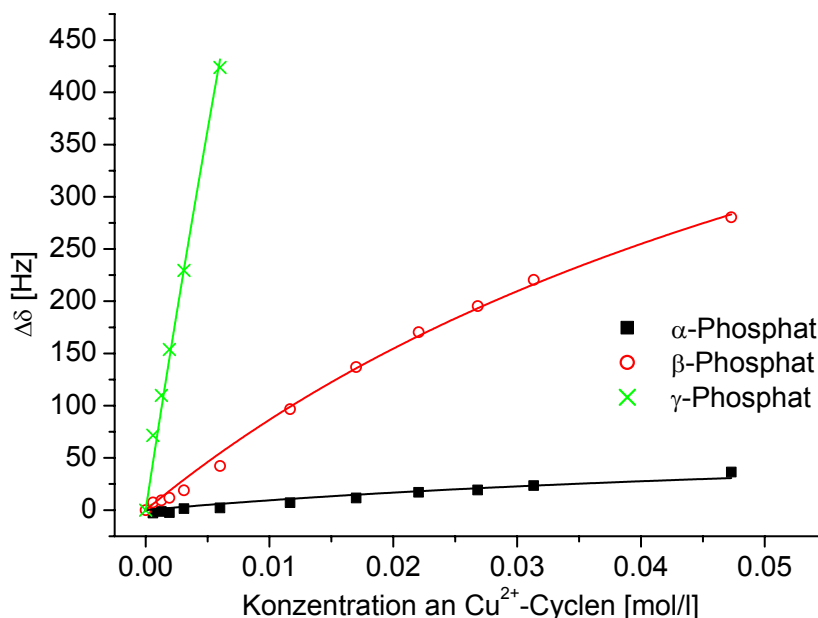


Abb. 4.3.4: Verlauf der Änderung der chemischen Verschiebung während der Titration von 1.3 mM Ras(T35A)·GppNHp mit 0 bis 50 Äquivalenten an Cu²⁺-Cyclen in Messpuffer A mit 2 mM DSS und 5% D₂O bei 278K. In grün, rot und schwarz dargestellt ist die jeweilige Anpassung der Gleichung **3.15** an die Datenpunkte, wobei der K_D-Wert jeweils gleichzeitig angepasst wurde. Dieser K_D-Wert beträgt 72 ± 16 mM.

Bei dieser Anpassung wurde der K_D -Wert jeweils gleichzeitig in allen drei Funktionen variiert. Der somit erhaltene K_D -Wert für die Bindung von Cu^{2+} -Cyclen an Ras(T35A)·GppNHp beträgt 72 ± 16 mM.

4.3.3.2 Relaxationszeitmessungen

Der Abstand zwischen einem paramagnetischen und einem NMR-aktiven Kern ist umgekehrt proportional zu der sechsten Wurzel der Relaxationsraten (R_1 und R_2) des NMR-aktiven Kerns (Arnesano *et al.* 2003). Wenn nun das Cu^{2+} -Cyclen direkt oder in der Nähe des γ -Phosphats des Ras-Nukleotid-Komplexes bindet, kann der Abstand der ^{31}P -Kerne zu dem Cu(II)-Ion mit Hilfe der longitudinalen Relaxationsraten R_{1c} der einzelnen Phosphorkerne errechnet werden. Deshalb wurden Relaxationszeitmessungen bei der Titration von Ras(T35A)·GppNHp mit Cu^{2+} -Cyclen mit Hilfe von *inversion recovery* Experimenten durchgeführt, die als pseudo-2D ^{31}P -NMR-Spektren aufgenommen wurden.

Die damit erhaltenen ^{31}P -NMR-Spektren wurden mit einer Funktion aus mehreren Lorentzlinien angeglichen, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben ist. Dabei wurden die Kopplungskonstanten ($^2J_{\alpha\beta} = 20.7$ Hz, $^2J_{\beta\gamma} = 7.8$ Hz und $^4J_{\alpha\gamma} = 0$ Hz) verwendet, die für das freie GppNHp bestimmt wurden (Spoerner *et al.* 2005B). Die jeweiligen Flächen der drei Phosphorsignale wurden gegen die verschiedenen Wartezeiten τ aufgetragen und die jeweiligen Relaxationszeiten T_1 bzw. Relaxationsraten R_1 ($= 1/T_1$) mit Hilfe von Gleichung 3.3 für die einzelnen Titrationsschritte berechnet. Diese wurden anschließend gegen die jeweilige Konzentration an Cu^{2+} -Cyclen aufgetragen und die Komplex-Relaxationsraten R_{1c} der einzelnen Phosphorkerne von Ras(T35A)·GppNHp (im Komplex mit Cu^{2+} -Cyclen) mit Hilfe von Gleichung 3.5 ermittelt (siehe **Abb. 4.3.5**). Dazu wurde der in Kapitel 4.3.3.1 ermittelte K_D -Wert von 72 mM für die Ras-Cyclen-Bindung eingesetzt.

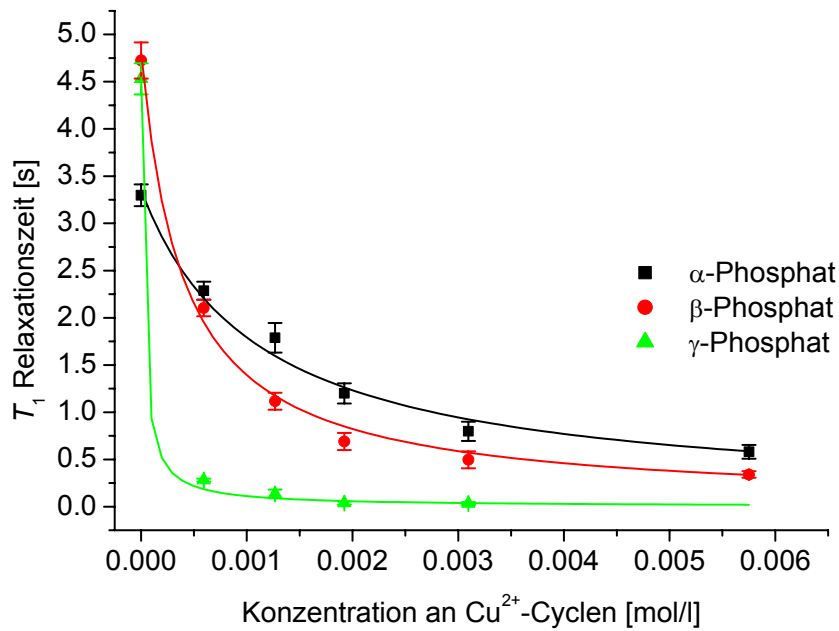


Abb. 4.3.5: Veränderung der Relaxationszeiten während der Titration von 1.3 mM Ras(T35A)-GppNHp mit 0 bis 5 Äquivalenten an Cu²⁺-Cyclen in Messpuffer A mit 2 mM DSS und 5% D₂O. In grün, rot und schwarz dargestellt ist die jeweilige Anpassung der Gleichung 3.5 an die Datenpunkte. Die Fehler der Datenpunkte resultieren aus den vorher berechneten Relaxationszeiten für die einzelnen Phosphorkerne bei den verwendeten Konzentrationen. Die erhaltenen Relaxationszeiten T_{1c} des Komplexes sind 51 ± 4 ms für das α -Phosphat, 26 ± 1 ms für das β -Phosphat und 1.6 ± 0.1 ms für das γ -Phosphat.

Schließlich konnten mit Hilfe von Gleichung 3.8 aus den Relaxationsraten R_{1c} ($= 1/T_{1c}$) die Abstände der jeweiligen Phosphorkerne zum Cu(II)-Ion des Cyclens berechnet werden. Die Werte der einzelnen Cu(II)-³¹P-Abstände, die in Tabelle 4.3.2 aufgeführt sind, betragen 5.4 Å für das α -Phosphat, 4.8 Å für das β -Phosphat und 3.0 Å für das γ -Phosphat.

| | T_{1f} (Ras(T35A)-GppNHp) | T_{1c} | R_{1c} [1/s] | Abstand zum Cu(II)-Ion |
|--------------------|-----------------------------|------------------|----------------|------------------------|
| α -Phosphat | 3.4 ± 0.1 s | 51 ± 4 ms | 19.6 | 5.4 ± 0.5 Å |
| β -Phosphat | 4.8 ± 0.2 s | 26 ± 1 ms | 38.5 | 4.8 ± 0.5 Å |
| γ -Phosphat | 4.5 ± 0.2 s | 1.6 ± 0.1 ms | 625 | 3.0 ± 0.2 Å |

Tab. 4.3.2: Auflistung der einzelnen Ergebnisse der Relaxationszeitmessungen. Die Fehler der Abständen zum Cu(II)-Ion wurden mit Hilfe der Relaxationszeitenfehler abgeschätzt.

4.3.4 Untersuchung der Bindungsstellen mit Hilfe von 2D-NMR-Experimenten an ^{15}N -markiertem Ras(T35A)-GppNHp

4.3.4.1 Zuordnung der Signale von ^1H - ^{15}N -NMR-Experimenten mit Hilfe von Ras(T35S)-GppNHp

Da die Struktur von Ras(T35A) noch nicht gelöst ist, gibt es in der Literatur noch keine Angaben zu den chemischen Verschiebungen der Amidprotonen und der ^{15}N -Kerne des Proteinrückgrats. Diese chemischen Verschiebungen sind jedoch schon für das strukturell ähnliche Ras(T35S) bekannt (Schumann *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Deshalb wurde die Zuordnung in Zusammenarbeit mit F. Schumann (Universität Regensburg) auf das Ras(T35A)-GppNHp übertragen. Da die Zuordnung der Serin-Mutante jedoch nur bei einem pH-Wert von 5.5 in einem Phosphatpuffer bekannt ist, musste eine ^{15}N -markierte Ras(T35A)-GppNHp Probe in Messpuffer B mit Hilfe von wässriger 0.1 M HCl-Lösung schrittweise von pH 7.4 auf 5.5 eingestellt werden.

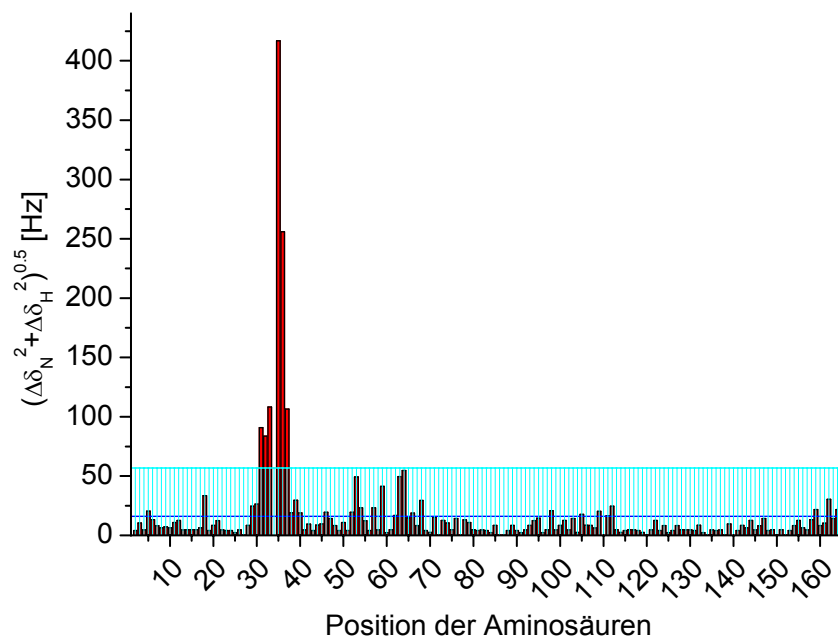


Abb. 4.3.6: Änderungen der chemischen Verschiebungen (rot) der Aminosäuren ($\Delta\delta = (\Delta\delta_{\text{N}}^2 + \Delta\delta_{\text{HN}}^2)^{0.5}$) aus den ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren der pH-Titration von 1.3 mM Ras(T35A)-GppNHp mit 0.1 M HCl-Lösung in Messpuffer B mit 2 mM DSS und 10% D_2O bei 293K. In dunkelblau dargestellt ist der Mittelwert der Änderung (16.1 Hz) und in hellblau die Standardabweichung (40.7 Hz).

Bei gleichem pH-Wert wurden anschließend die aufgenommenen ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren von T35A und T35S verglichen und eine vorläufige Zuordnung für Ras(T35A)·GppNHp erstellt. Diese wurde anschließend wieder schrittweise auf den neutralen pH-Wert zurück übertragen (**Abb. 4.3.6**). Dabei fällt auf, dass die stärksten Veränderungen im Bereich der Schalter I Region zu finden sind.

4.3.4.2 Titration von Ras(T35A)·GppNHp mit Cu^{2+} -Cyclen

Um mehr Informationen über mögliche Bindungsstellen des Cu^{2+} -Cyclens am Ras zu erhalten, wurde ^{15}N -markiertes Ras(T35A)·GppNHp schrittweise mit bis zu 5 Äquivalenten Cu^{2+} -Cyclen versetzt und dabei zu jedem der 4 Titrationsschritte ein ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrum aufgenommen. Wie bei Arnesano *et al.* (2003) beschrieben ist, kann in einem Bereich von etwa 11 Å um das paramagnetische Cu(II)-Ion aufgrund der abstandsabhängigen, starken Linienverbreiterung durch das ungepaarte Elektron kein Protonsignal beobachtet werden. Dieser Bereich beträgt für ^{15}N -Kerne nur 6 Å um das paramagnetische Zentrum herum (Arnesano *et al.* 2003). Mit Hilfe dieses Effekts können nicht nur die Änderungen der chemischen Verschiebungen, sondern ebenfalls die Änderungen in den Intensitäten der einzelnen Aminosäuresignale während der Titration beobachtet werden.

Da allerdings die Änderungen in den chemischen Verschiebungen wegen der Verbreiterung der Peaks besser mit Zn^{2+} -Cyclen als mit dem paramagnetischen Cu(II)-Cyclen zu beobachten sind, wird hier nur auf die Änderungen der Intensitäten näher eingegangen (siehe Kapitel 4.3.4.3). In Abbildung **4.3.7** ist die Änderung der Signalintensitäten von Ras(T35A)·GppNHp mit und ohne Cu^{2+} -Cyclen abgebildet.

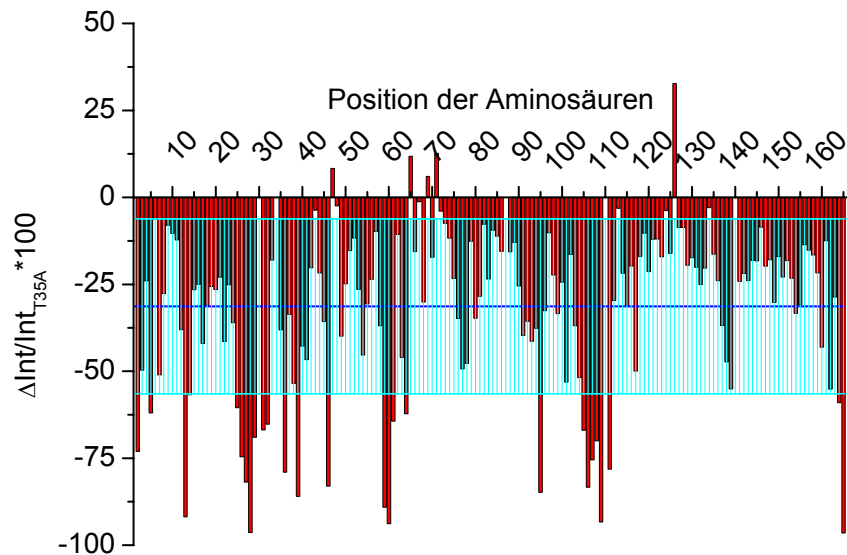


Abb. 4.3.7: Änderungen der Intensität (rot) der Aminosäuresignale aus den ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren der Titration von 1.3 mM Ras(T35A)-GppNHp mit Cu^{2+} -Cyclen in Messpuffer B mit 2 mM DSS und 10% D_2O bei 293K. In dunkelblau dargestellt ist der Mittelwert der Änderung (31.3%) und in hellblau die Standardabweichung (25.1%).

Um diese Änderungen bestimmen zu können, wurde das Endspektrum der Titration (mit 5 eq. Cu^{2+} -Cyclen) auf das Anfangsspektrum referenziert. Dazu wurden die Signalintensitäten einzelner, an der Bindung nicht beteiligter Aminosäuren in beiden NMR-Spektren verglichen. Als nicht an der Bindung beteiligt wurden diejenigen Aminosäuren bezeichnet, die bei der Titration weder an Intensität verloren haben, noch Änderungen in ihren chemischen Verschiebungen zeigten. Aus diesen wurde für jedes dieser Signale jeweils ein Multiplikationsfaktor berechnet, dieser gemittelt und das Endspektrum mit diesem Faktor (1.15) multipliziert, der in etwa der Verdünnung durch die Zugabe der Cu^{2+} -Cyclen-Lösung entspricht.

Zur Verdeutlichung der Auswirkung des paramagnetischen Cu(II) -Ions auf die Signale ist in Abbildung 4.3.8 ein Ausschnitt des ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrums von Ras(T35A)-GppNHp (grün) überlagert mit dem gleichen Ausschnitt nach der Titration (rot) abgebildet. Darin ist die Linienverbreiterung der beiden Glycine in den Positionen 13 und 60 gut zu erkennen, die zum nahezu vollständigen Verschwinden der Signale führt.

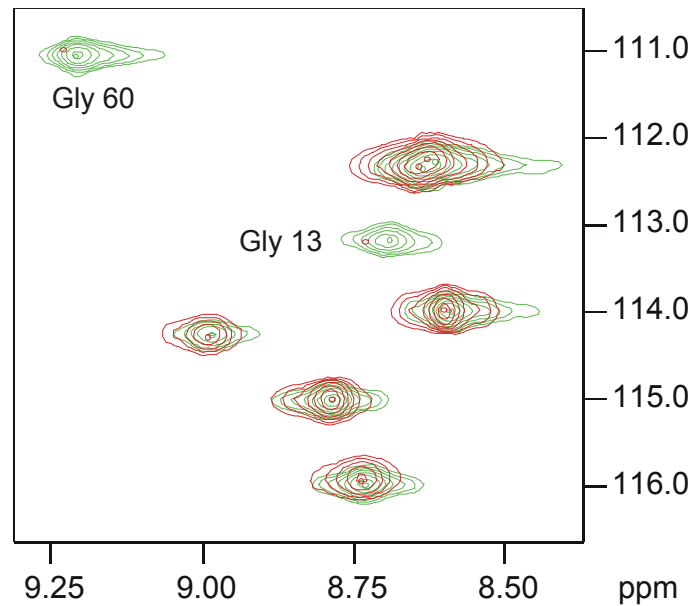


Abb. 4.3.8: Überlagerung zweier ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren von 1.3 mM Ras(T35A)·GppNHp ohne (grün) und mit 5 eq. Cu^{2+} -Cyclen (rot) in Messpuffer B mit 2 mM DSS und 10% D_2O bei 293K.

Mit Ausnahme der Aminosäure in Position 95 können alle verbreiterten Signale in drei unabhängige Bindungsstellen eingeteilt werden. In Abbildung 4.3.9 sind diese in der bereits veröffentlichten Kristallstruktur von Ras(wt)·GppNHp (Pai *et al.* 1990) farbig hervor gehoben. Die drei möglichen Bindungsstellen sind im Folgenden näher aufgeführt:

- Bindungsstelle 1 liegt im Bereich des γ -Phosphats des an das Ras-Protein gebundenen Nukleotids. Davon beeinflusst sind die Aminosäuren Gly12, Gly13, Ile36, Ala59, Gly60, Gln61 und Tyr64.
- Bindungsstelle 2 befindet sich am Ende der α -Helix vor der Schalter I Region. Die am stärksten beeinflussten Aminosäuren sind His27 und Phe28.
- Bindungsstelle 3 befindet sich im Bereich der Schleife, die die Aminosäuren Asp105 bis Met110 ausbilden, und dort in der Nähe von Asp108, die den größten Effekt aufweist.

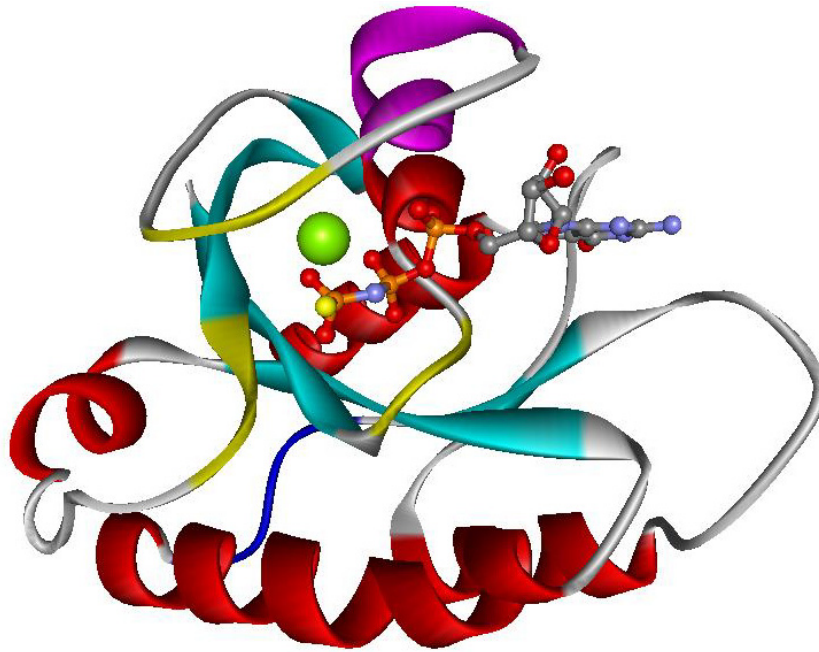


Abb. 4.3.9: *Ribbon-Plot-Darstellung der Kristallstruktur von Ras(wt)·GppNHp (Pai *et al.* 1990) mit dem Mg(II)-Ion in grün und dem Nukleotid in „Ball & Stick“-Darstellung in einem 45°-Winkel perspektivisch abgebildet. Gelb ist die Bindungsstelle 1, violett die vermutete Bindungsstelle 2 und dunkelblau die vermutete Bindungsstelle 3 markiert.*

4.3.4.3 Titration von Ras(T35A)·GppNHp mit Zn^{2+} -Cyclen

Um die Bindung von Zn^{2+} -Cyclen an das Ras-Protein genauer zu charakterisieren, wurden ^1H - ^{15}N -TROSY-NMR-Spektren von ^{15}N -markiertem Ras(T35A)·GppNHp in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen an Zn^{2+} -Cyclen aufgenommen. Mit Hilfe dieser Spektren können Änderungen in den chemischen Verschiebungen der Amidsignale detektiert werden, die durch die Bindung des Cyclens hervorgerufen werden. Diese Änderungen können entweder aus einer direkten Bindung oder aber aus indirekten Strukturänderungen resultieren, die durch die Bindung des Cyclens hervorgerufen werden.

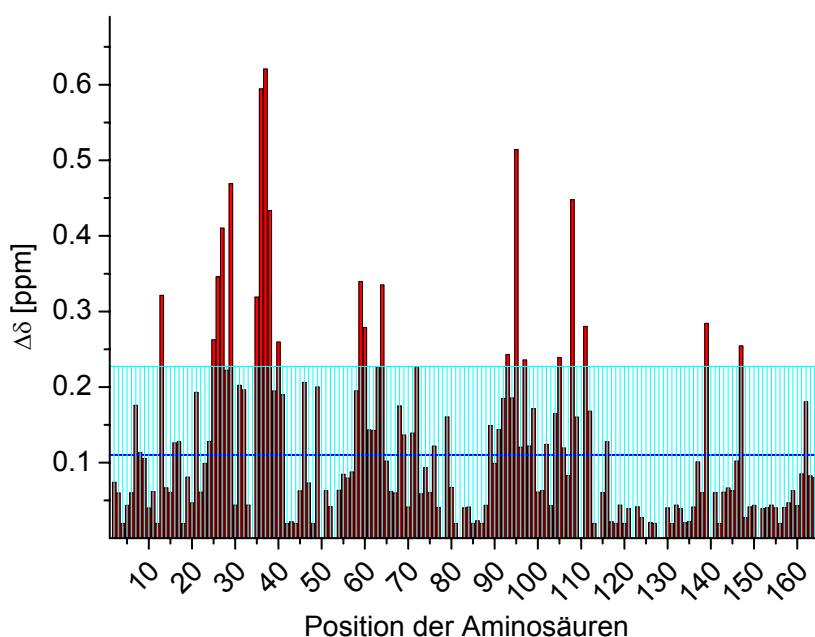


Abb. 4.3.10: Änderungen in den chemischen Verschiebungen der Amidsignale (rot) aus den ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren der Titration von 0.84 mM ^{15}N -Ras(T35A)·GppNHp mit 10 Äquivalenten Zn^{2+} -Cyclen in Messpuffer B mit 2 mM DSS und 10% D_2O bei 293K. In dunkelblau dargestellt ist der Mittelwert der Änderung (0.11 ppm) und in hellblau die Standardabweichung (0.12 ppm). Die Änderungen ($\Delta\delta$) wurden, wie in Geyer *et al.* (2005) beschrieben, aus den ^{15}N - und den ^1H -Verschiebungen berechnet. Dazu wurde ein Mittelwert aus beiden Änderungen berechnet, wobei die Änderung der Protonenverschiebung mit einem auf die jeweilige Aminosäure normierten Gewichtungsfaktor multipliziert wurde.

Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Amidsignale wurde, wie unter Kapitel 4.3.4.1 beschrieben, in Zusammenarbeit mit F. Schumann (Universität Regensburg) durchgeführt. Zn^{2+} -Cyclen wurde in elf Schritten bis zu einem molaren Verhältnis von 20:1 zu einer 0.84 mM Ras(T35A)·GppNHp-Lösung in Messpuffer B bei 20°C titriert. Ab dem Verhältnis von 10:1 beginnen die Ras-Proben im NMR-Röhrchen langsam auszufallen. Daher kann die Auswertung oberhalb des Verhältnisses von 10:1 nicht mehr eindeutig durchgeführt werden. In Abbildung 4.3.10 sind die resultierenden chemischen Verschiebungen bei einem Verhältnis von 10:1 von Zn^{2+} -Cyclen zu Ras(T35A) dargestellt. Mit dieser Titration konnten die in Kapitel 4.3.4.2 ermittelten drei Bindungsstellen verifiziert werden. Zur Verdeutlichung sind die Änderungen in den Signalintensitäten bei der Titration mit Cu^{2+} -Cyclen und in den chemischen Verschiebungen bei der Titration mit Zn^{2+} -Cyclen zusätzlich in CPK-Darstellungen von Ras(wt)·GppNHp (Pai *et al.* 1990) farbig hervorgehoben (Abb. 4.3.11).

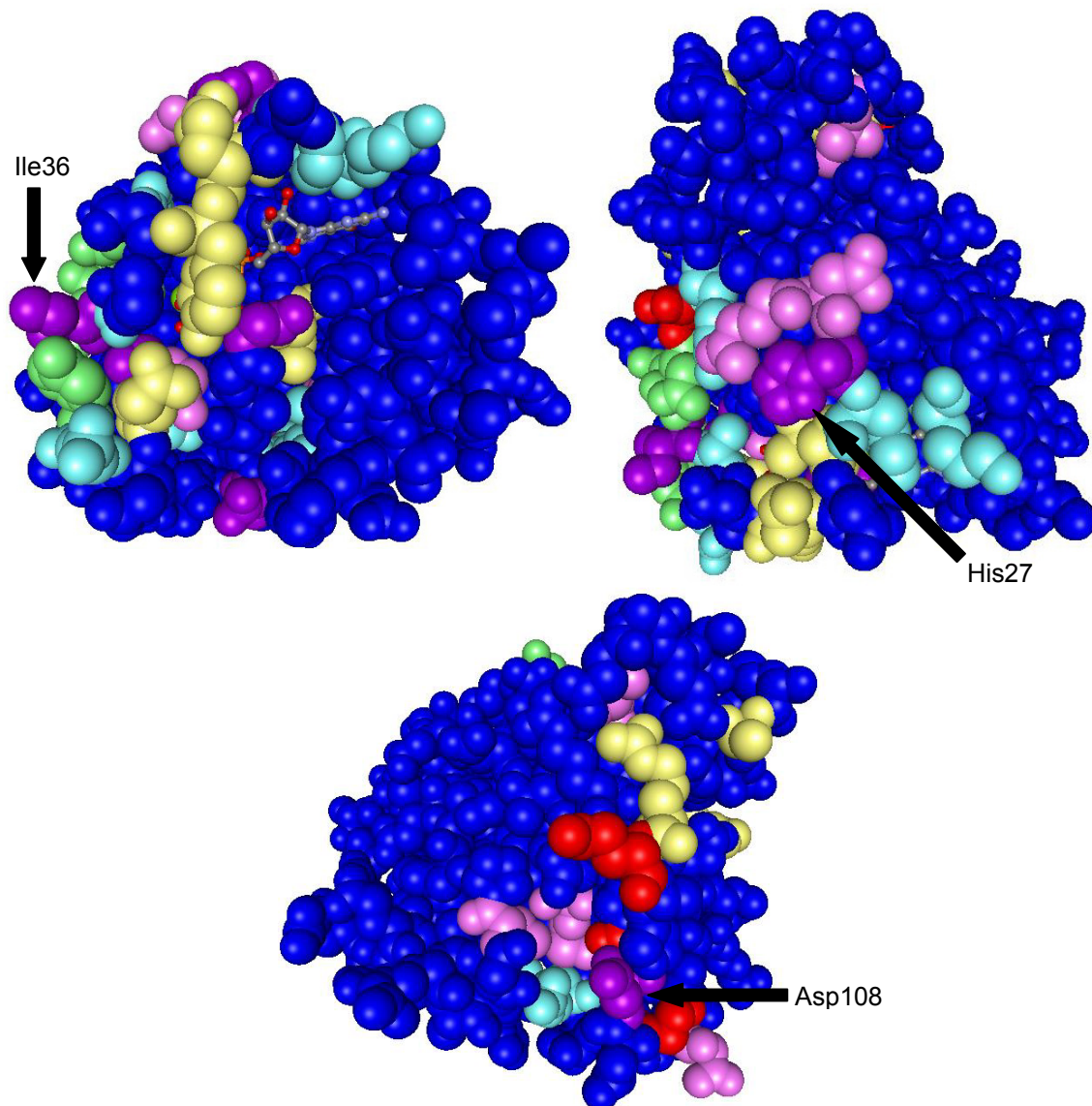


Abb. 4.3.11: In CPK-Darstellung ist die Kristallstruktur von Ras(wt)·GppNHp (Pai *et al.* 1990) mit dem Nukleotid in „Ball & Stick“-Darstellung in einem 45°-Winkel perspektivisch abgebildet. Links oben ist die Ansicht auf das Nukleotid wie in **Abb. 4.3.9** gezeigt. Rechts oben ist diese Ansicht um 90° in der X-Y-Ebene (Blick von oben) und unten um 180° um die Z-Achse (Blick von hinten) gedreht. Rot sind die Aminosäuren markiert, deren Amidsignale mehr als 80% (gelb mehr als 55%) ihrer Intensität bei der Titration mit Cu^{2+} -Cyclen verlieren. Hellgrün sind die Aminosäuren markiert, deren chemische Verschiebungen der Amidsignale sich bei der Titration mit Zn^{2+} -Cyclen mehr als 0.3 ppm (hellblau mehr als 0.2 ppm) ändern. In Violett sind die Aminosäuren hervorgehoben, die starke Änderungen sowohl in den chemischen Verschiebungen, als auch in den Signalintensitäten zeigen und in rosa diejenigen, deren Verschiebungsänderungen mehr als 0.2 ppm und deren Singalintensitätsänderungen mehr als 55% betragen. Mit Pfeilen sind die wichtigsten Aminosäuren in diesen Regionen, den Bindungsstellen des Cyclens, markiert.

Die Ergebnisse sind zusätzlich in Tabelle **4.3.3** zusammengefasst.

| Änderungen in den Amidsignalen | Aminosäuren |
|--|-----------------------------------|
| Signalintensität um mehr als 80% verringert (rot in Abb. 4.3.11) | 39, 106, 107, 109, 165 |
| Signalintensität um mehr als 55% verringert (gelb in Abb. 4.3.11) | 2,5,14, 29, 31, 32, 61, 64, 164 |
| Verschiebung der Signale um mehr als 0.3 ppm (hellgrün in Abb. 4.3.11) | 37, 38 |
| Verschiebung der Signale um mehr als 0.2 ppm (hellblau in Abb. 4.3.11) | 28, 35, 40, 63, 72, 93, 97, 147 |
| Starke Intensitätsverringerng und Signalverschiebung (violett in Abb. 4.3.11) | 13, 27, 36, 59, 95, 108 |
| Intensitätsverringerng (> 55%) und Signalverschiebung (> 0.2ppm) (rosa in Abb. 4.3.11) | 25, 26, 46, 60, 64, 105, 111, 139 |

Tab. 4.3.3: Zusammenfassung der Änderungen der Signalintensitäten bzw. der chemischen Verschiebungen in den 2D-NMR-Titrationsen von ^{15}N -Ras(T35A)-GppNHp mit Cu^{2+} -Cyclen bzw. Zn^{2+} -Cyclen.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mittels der in Kapitel 3.4.4 vorgestellten Methode. Dazu wurden zunächst drei Aminosäuren ausgewählt, die repräsentativ für die drei Bindungsstellen untersucht wurden. Als Aminosäuren wurden hierfür das Isoleucin in Position 36 stellvertretend für die Bindungsstelle 1, das Histidin 27 für die Bindungsstelle 2 und das Aspartat 108 für die Bindungsstelle 3 ausgewählt. Die Auswertung wurde in drei Schritten durchgeführt:

1. Ermittlung der maximalen Änderungen der chemischen Verschiebung der ausgewählten Aminosäuren,
2. Berechnung der freien Ligandkonzentration aus den maximalen Änderungen und
3. Berechnung der einzelnen Dissoziationskonstanten aus den chemischen Verschiebungen.

Für die Berechnung der jeweiligen maximalen Änderungen im schnellen Austausch wurden die chemischen Verschiebungen der ^{15}N -Kerne der sich am stärksten ändernden Aminosäuren der einzelnen Bindungsstellen gegeneinander aufgetragen. Diese spezielle Auswertungsmethode ist notwendig, da zwei der drei für die Bindungsstellen repräsentativen Aminosäuren durch die Titrationsexperimente den Sättigungsbereich nicht erreichen. Deswegen ist eine Auswertung nach Gleichung **3.15** mit einem 1:1 Bindungsmodell im schnellen Austausch für diese zwei Aminosäuren nicht direkt möglich. Daher wurde ein indirekte Bestimmung der maximalen Verschiebungsänderungen für die zwei nur

teilweise gesättigten Aminosäuren verwendet und die Auswertung mit Hilfe von Gleichung **3.13** durchgeführt wurde. Um aus den Auftragungen der chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäuren gegeneinander die maximalen Änderungen ($\Delta\delta_{max}$) bestimmen zu können, musste zunächst der $\Delta\delta_{max}$ -Wert einer Aminosäure zusätzlich zu den schon bekannten chemischen Verschiebungen der Aminosäuren im freien Protein (δ_f) als Ausgangswert bestimmt werden. Ohne diese erste maximale Änderung der chemischen Verschiebung bei vollständiger Komplexierung des Proteins mit Cyclen führte die Anpassung der Gleichung **3.13** an die erhaltenen Datenpunkte nicht mehr zu nachvollziehbaren Ergebnissen. Diese maximale Änderung $\Delta\delta_{max}$ kann durch die Auftragung der jeweiligen Änderung der chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta$) der Aminosäure gegen die Konzentration an Cyclen mit Hilfe von Gleichung **3.15** bestimmt werden, wenn die Änderung in einen Sättigungsbereich übergeht.

Es ist davon auszugehen, dass die Bindungsstelle mit der höchsten Affinität und mit der räumlich größten Distanz zu den anderen Bindungsstellen, die geringste Beeinflussung durch die Bindung des Cyclens an die anderen Stellen erfährt. Das Asp108 der vermuteten Bindungsstelle 3 befindet sich im Protein am weitesten von den anderen beiden Bindungsstellen entfernt. Dazu kommt, dass sich die chemische Verschiebung des ^{15}N -Kerns dieses Asp108 bereits nach wenigen Titrationschritten nicht mehr wesentlich ändert. Diese frühzeitige Sättigung weist auf die höchste Affinität des Zn^{2+} -Cyclens zur Bindungsstelle 3 hin. Deswegen wurde die Aminosäure Asp108 ausgewählt, um den ersten $\Delta\delta_{max}$ -Wert des mit Cyclen vollständig komplexierten Proteins zu bestimmen.

Um den ersten $\Delta\delta_{max}$ -Wert zu erhalten wurden die $\Delta\delta$ -Werte von Asp108 gegen die Konzentration an Zn^{2+} -Cyclen aufgetragen und die erhaltenen Datenpunkte mittels Gleichung **3.15** angepasst (**Abb. 4.3.12A**). Dabei konnte ein vorläufiger K_D -Wert mit 0.81 mM für die Bindung an die Bindungsstelle 3 bestimmt werden. Die aus der Auswertung ermittelte maximale Verschiebung, $\Delta\delta_{max}(\text{Asp108}) = 0.38 \pm 0.02$ ppm, wurde als Parameter für die Anpassung von Gleichung **3.13** an die Datenpunkte der Auftragungen $\delta(\text{His27})$ gegen $\delta(\text{Asp108})$ (**Abb. 4.3.12B**) festgesetzt. Ausgehend von diesem Wert für $\Delta\delta_{max}(\text{Asp108})$ konnten nun die maximalen Änderung der beiden anderen Aminosäuren angepasst werden. Dazu wurde die aus der Auftragungen der ^{15}N -Verschiebungen $\delta(\text{His27})$ gegen $\delta(\text{Asp108})$ erhaltenen $\Delta\delta_{max}$ -Werte für His27 ($\Delta\delta_{max}(\text{His27}) = -1.19$ ppm)

anschließend als „Startparameter“ für die Anpassung der Auftragung der ^{15}N -Verschiebungen $\delta(\text{Ile36})$ gegen $\delta(\text{His27})$ (**Abb. 4.3.12C**) an Gleichung **3.13** eingesetzt.

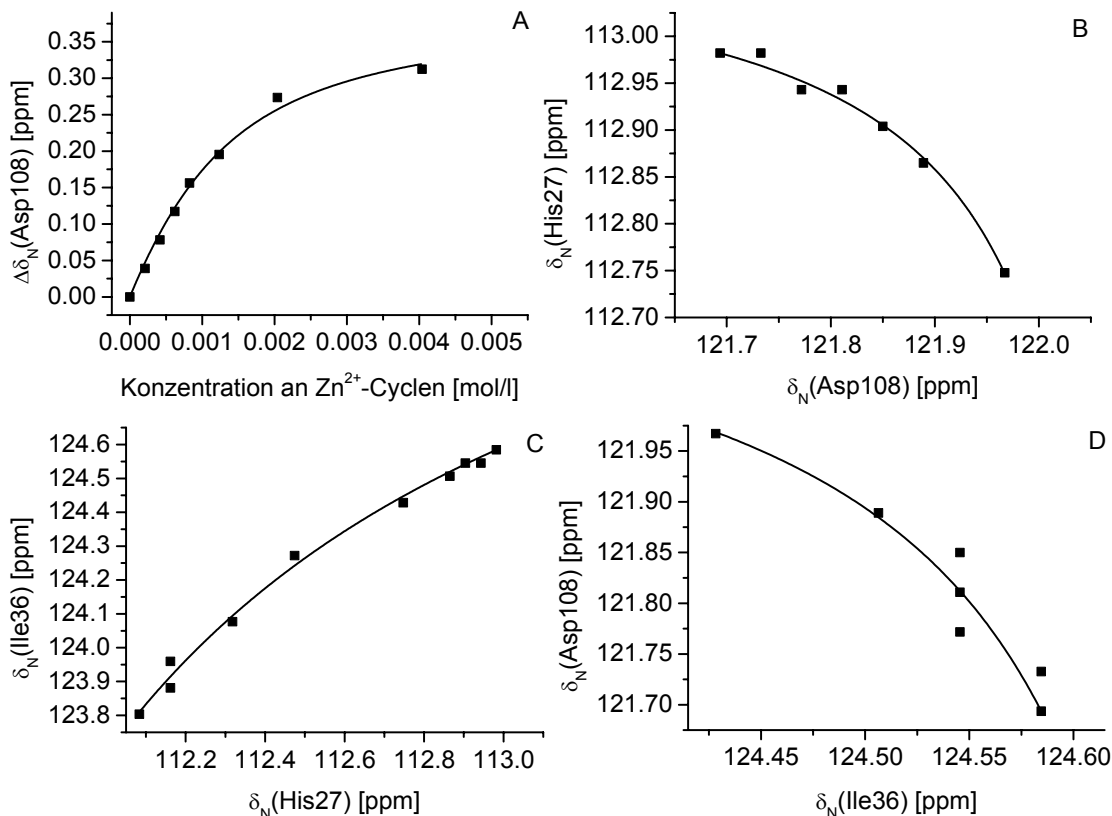


Abb. 4.3.12: Änderung der chemischen Verschiebungen der ausgewählten, für die drei Bindungsstellen repräsentativen Aminosäuren Ile36, His27 und Asp108 aus den ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren der Titration von 0.84 mM ^{15}N -Ras(T35A)-GppNHp mit 0 bis 50 Äquivalenten an Zn^{2+} -Cyclen in Messpuffer B mit 2 mM DSS und 10% D_2O bei 293K. A: Als Linie dargestellt ist die Anpassung der Gleichung **3.15** an die Datenpunkte zur Ermittlung der maximalen Änderung der chemischen Verschiebung des Amidstickstoffs von Asp108 ($\Delta\delta_{\text{max}}(\text{Asp108}) = 0.38 \pm 0.02$ ppm, „ $K_{\text{D}} = 0.81$ mM“). B: Als Linie dargestellt ist die Anpassung der Gleichung **3.13** an die Datenpunkte zur Ermittlung der maximalen Änderung der chemischen Verschiebung des Amidstickstoffs von His27 ($\Delta\delta_{\text{max}} = -1.19$). Zusätzlich konnte das Verhältnis der K_{D} -Werte von His27 zu Asp108 ($K_{\text{D}}(\text{His27})/K_{\text{D}}(\text{Asp108}) = 8.9$) bestimmt werden. C: Als Linie dargestellt ist die Anpassung der Gleichung **3.13** an die Datenpunkte zur Ermittlung der maximalen Änderung der chemischen Verschiebung des Amidstickstoffs von Ile36 ($\Delta\delta_{\text{max}} = -1.14$). Zusätzlich konnte das Verhältnisses der K_{D} -Werte von Ile36 zu His27 ($K_{\text{D}}(\text{Ile36})/K_{\text{D}}(\text{His27}) = 2.0$) bestimmt werden. D: Als Linie dargestellt ist die Anpassung der Gleichung **3.13** an die Datenpunkte zur Überprüfung des Verhältnisses der K_{D} -Werte von Asp108 zu Ile36 ($K_{\text{D}}(\text{Asp108})/K_{\text{D}}(\text{Ile36}) = 0.08$). Der aus den zwei anderen Verhältnissen berechnete Wert beträgt 0.06.

Aus der jeweiligen Anpassung von Gleichung **3.13** an diese beiden Auftragungen konnten zudem die Verhältnisse der einzelnen Dissoziationskonstanten $K_D(\text{His27})/K_D(\text{Asp108}) = 8.9$ und $K_D(\text{Ile36})/K_D(\text{His27}) = 2.0$ bestimmt werden. Eine weitere Anpassung wurde für die Auftragung der ^{15}N -Verschiebungen $\delta(\text{Asp108})$ gegen $\delta(\text{Ile36})$ (**Abb. 4.3.12D**) vorgenommen. Diese diente jedoch nur zur qualitativen Überprüfung der anderen Resultate, da die erhaltenen Datenpunkte der zugrundeliegenden Auftragung nur unzureichend anpassbar waren. Das daraus resultierende Verhältnis der K_D -Werte $K_D(\text{Asp108})/K_D(\text{Ile36})$ liegt mit 0.08 im Bereich des aus den beiden anderen Verhältnissen berechneten Wertes von 0.06.

Aus den erhaltenen $\Delta\delta_{\text{max}}$ -Werten der einzelnen Aminosäuren (0.38 ppm für Asp108, -1.19 ppm für His27 und -1.14 ppm für Ile36) konnte mit Hilfe der absoluten Konzentrationen für das Protein und für das Zn^{2+} -Cyclen und mit den $\Delta\delta$ -Werten zu jedem Titrationsschritt die freie Konzentration an Zn^{2+} -Cyclen mit Gleichung **3.16** berechnet werden.

Aus der Auftragung der Änderung der chemischen Verschiebungen der einzelnen Aminosäuren gegen die berechneten freien Konzentrationen an Zn^{2+} -Cyclen zu jedem Titrationsschritt konnten schließlich die Dissoziationskonstanten für die jeweiligen Bindungsstellen mit Gleichung **3.17** angepasst werden (**Abb. 4.3.13**). Dabei konnte ein K_D -Wert von 0.64 ± 0.08 mM für die Bindungsstelle 3 mit der höchsten Affinität zum Zn^{2+} -Cyclen berechnet werden. Die weiteren Werte für die Bindungsstelle 2 sind 4.2 ± 0.2 mM und 6.7 ± 0.4 mM für die Bindungsstelle 1.

Werden diese Dissoziationskonstanten nun ins Verhältnis zum K_D -Wert für das Asp108 gesetzt, kann für das Verhältnis $K_D(\text{His27})/K_D(\text{Asp108})$ einen Wert von 6.5 und für $K_D(\text{Ile36})/K_D(\text{Asp108})$ einen Wert von 10.4 erhalten werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Auswertung nach Gleichung **3.13** sind die Werte etwas kleiner und zeigen somit jeweils eine etwas höhere Affinität des Zn^{2+} -Cyclens zu den einzelnen Bindungsstellen auf.

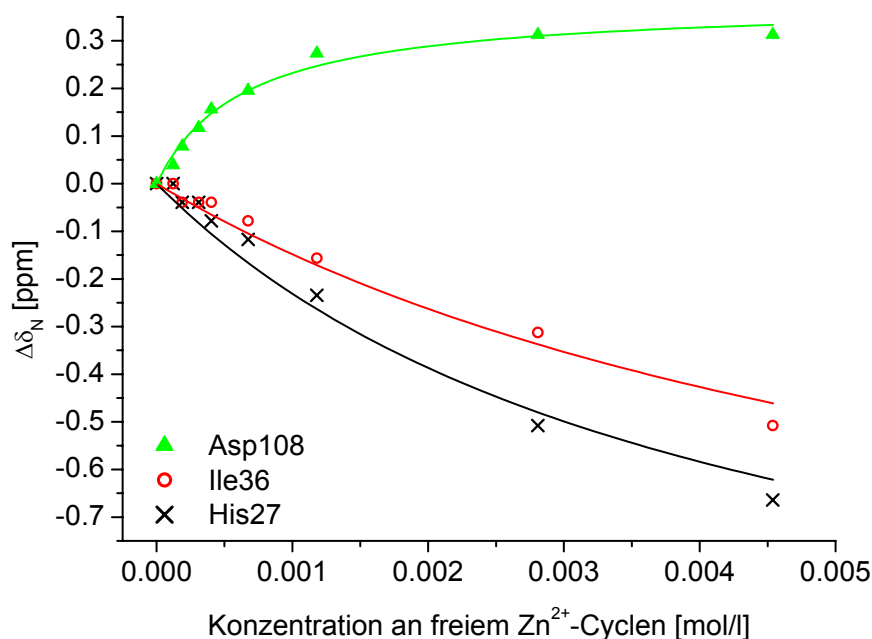


Abb. 4.3.13: Auftragung der Änderung der Amidstickstoff-Verschiebungen der ausgewählten, für die drei Bindungsstellen repräsentativen Aminosäuren Ile36, His27 und Asp108 gegen die jeweilige freie Konzentration an Zn^{2+} -Cyclen. In schwarz dargestellt ist die Anpassung der Gleichung 3.17 an die Datenpunkte zur Ermittlung der Dissoziationskonstante von His27 ($K_D(\text{His27}) = 4.2 \pm 0.2 \text{ mM}$). In rot dargestellt ist die Anpassung der Gleichung 3.17 an die Datenpunkte zur Ermittlung der Dissoziationskonstante von Ile36 ($K_D(\text{Ile36}) = 6.7 \pm 0.4 \text{ mM}$). In grün dargestellt ist die Anpassung der Gleichung 3.17 an die Datenpunkte zur Ermittlung der Dissoziationskonstante von Asp108 ($K_D(\text{Asp108}) = 0.64 \pm 0.08 \text{ mM}$). Alle angegebenen Fehler beziehen sich auf die Anpassungsfehler.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 4.3.4 zusammengefasst.

| Bindungsstelle | δ_f [ppm] | $\Delta\delta_{max}$ [ppm] | $K_D/K_D(\text{Asp108})$ | K_D [mmol/l] |
|----------------|------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------|
| 1: Ile36 | 124.58 | -1.14 | 10.4 (17.8) | 6.7 ± 0.4 (11.4) |
| 2: His27 | 112.98 | -1.19 | 6.5 (8.9) | 4.2 ± 0.2 (5.7) |
| 3: Asp108 | 121.69 | 0.38 ± 0.02 | 1 | 0.64 ± 0.08 (0.81) |

Tab. 4.3.4: Auflistung der einzelnen Ergebnisse zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Zn^{2+} -Cyclen im Komplex mit den einzelnen Bindungsstellen des Ras-Proteins. Der geschätzte Fehler beträgt bei den chemischen Verschiebungen des freien $\text{Ras(T35A)} \cdot \text{GppNHp}$ (δ_f) $\pm 0.05 \text{ ppm}$, bei den angepassten, maximalen Änderungen in den chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta_{max}$) $\pm 0.2 \text{ ppm}$. Die Werte in Klammern sind aus den Auswertungen nach Gleichung 3.13 und 3.15 (Abb. 4.3.12) errechnet. Die angegebenen Fehler der K_D -Werte beziehen sich auf die ausgegebenen Fehler der Anpassungen der Auswertungsgleichungen 3.15 und 3.17 an die Datenpunkte.

4.4 Moleküldynamikrechnungen

Für die MD-Rechnungen wurde das *docking*-Protokoll HADDOCK (Dominguez *et al.* 2003; Dijk *et al.* 2005), das für Protein-Protein Interaktionskalkulationen programmiert wurde, in Verbindung mit CNS (Brunger *et al.* 1998) verwendet. Mit den Modifizierungen, die in Kapitel 3.5 aufgeführt sind, kann dieses Protokoll auch für die Berechnung von Protein-Ligand-Komplexen verwendet werden. Wie Schieborr *et al.* (2005) berichteten, sind dazu nur wenige NMR-Informationen notwendig, um eine einzelne Komplexstruktur zu berechnen. Wegen der doch zu geringen Informationen über die Bindungsstellen 2 und 3 und wegen der sonst zu komplexen Berechnungen wurden die MD-Rechnungen auf die Bindungsstelle 1 beschränkt, die im Bereich des γ -Phosphats des gebundenen Nukleotids liegt.

Um damit die Komplexstruktur von Cu^{2+} -Cyclen gebunden an Ras(T35A)-GppNHp abbilden zu können, wurden die Resultate der 2D-NMR-Experimente und der Relaxationszeitmessungen berücksichtigt. Da jedoch, wie schon in Kapitel 4.3 beschrieben, die Struktur von H-Ras im Zustand 1 noch nicht veröffentlicht ist, wurde die schon bekannte Ras(wt)-GppNHp-Struktur (Pai *et al.* 1990) modifiziert. Dazu wurde lediglich die Seitenkette des Threonins 35 in der PDB-Datei verändert, indem die Hydroxylgruppe durch ein Proton ersetzt und die endständige Methylgruppe entfernt wurde. Als Startparameter mussten zusätzlich Abstandstabellen eingegeben und flexible bzw. halb-flexible Reste definiert werden. Letztere werden direkt in die Laufdatei run.cns eingefügt. Für die Abstandstabellen wurden die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen zusammengefasst. Dabei wurden die Aminosäuren, die bei der Untersuchung der Bindung von Zn^{2+} -Cyclen an ^{15}N -Ras(T35A) im Bereich der Bindungsstelle 1 starke Verschiebungen aufwiesen, als uneindeutige Kontaktpartner des Cyclens verwendet und in der „AIR“ (= *ambiguous interaction restraints*) Tabelle aufgeführt. Mit Hilfe eines eingeführten *unambiguous table*, wurden die Abstandsinformationen aus den Cu^{2+} -Cyclen-Daten, wie die $\text{Cu(II)}\text{-}^{31}\text{P}$ -Abstände oder die Abstandsabhängigkeit der ^{15}N -Signalintensitäten vom ^{15}N -Cu(II)-Abstand, in HADDOCK eingeführt. Alle Daten sind in Tabelle 4.4.1 zusammengefasst.

| | | | | | | | |
|--|--|--|--|---|---|--|-----------------------------|
| Verschobene AS | 13, 21, 27-28, 35-38, 40, 59-60, 63-64, 72 | | | | | | |
| Verbreiterte AS | 13-14, 25-29, 31-32, 36, 39, 46, 59-61, 64 | | | | | | |
| „AIR“-Tabelle | 13, 35, 59, 63 | | | | | | |
| Abstände (Distanz, untere Begrenzung, obere Begrenzung) | Cu-P _α 5.4 0.3 0.5 | Cu-P _β 4.8 0.3 0.5 | Cu-P _γ 3.0 0.2 0.2 | Mg-O2 _β 2.7 0.2 0.1 | Mg-O2 _γ 2.5 0.1 0.1 | Mg-O _γ S17 2.3 0.1 0.2 | |
| Abstände (Distanz, untere Begrenzung, obere Begrenzung) | Cu-N13 6.0 4.0 0.0 | Cu-N14 6.0 4.0 2.0 | Cu-N36 6.0 4.0 0.0 | Cu-N59 6.0 4.0 0.0 | Cu-N60 6.0 4.0 0.0 | Cu-N61 6.0 4.0 2.0 | Cu-N64 6.0 4.0 2.0 |
| Halb-flexible Reste | 11-16, 30-38, 58-68 | | | | | | |
| Flexible Reste | 13-14, 21-22, 27-28, 35, 38-39, 40, 59, 63, 72 | | | | | | |

Tab. 4.4.1: Ergebnisse der 2D-NMR-Untersuchungen von Zn²⁺- und Cu²⁺-Cyclen mit Ras(T35A) und Übertrag auf die einzelnen Tabellen zum Einlesen in HADDOCK.

Die in der „AIR“-Tabelle aufgeführten Aminosäuren sind aufgrund ihrer Änderung in der chemischen Verschiebung und ihrer Lage nahe der Bindungsstelle 1 ausgewählt worden. Als halb-flexible Reste sind alle Aminosäuren ausgewählt worden, die sich in den an die Bindungsstelle 1 angrenzenden *Loop*-Regionen des P-*Loop* und den beiden Schalterregionen I und II befinden.

Die Aminosäuren, deren Signale in den 2D-NMR-Untersuchungen von ¹⁵N-Ras(T35A) mit Zn²⁺- und Cu²⁺-Cyclen (Kapitel 4.3.4) Verschiebungen und Verbreiterungen aufwiesen, wurden als flexibel definiert.

In vorangegangenen Rechnungen zeigte sich, dass eine Festlegung des Mg(II)-Ions wichtig für die Stabilisierung des Ras-Nukleotid-Komplexes ist. Ohne diese Stabilisierung zerfiel der Komplex häufig während des zweiten Schritts der Rechnungen. Gleiches gilt für die Abstände des Cu(II)-Ions zu den Cyclenatomen, die ebenfalls festgelegt werden mussten.

Aus diesen Gründen wurden in der Abstandstabelle folgende Werte festgelegt:

1. die Ergebnisse der Abstandsbestimmung aus den Relaxationszeiten,
2. die Abstände des Mg(II)-Ions zu ausgewählten Atomen des Ras-Nukleotid-Komplexes aus der veröffentlichten Röntgenstruktur von Ras(T35S)·GppNHp (Spoerner *et al.* 2001),
3. die Cu²⁺-Abstände zu den Cyclenatomen und
4. die Abstandsbegrenzungen für die einzelnen Cu(II)-¹⁵N-Abstände, wie in Arnesano *et al.* (2003) beschrieben.

Eine weitere Veränderung wurde in den Energiebegrenzungen durchgeführt. Dazu wurden die Energiebegrenzungen für die Einhaltung der Abstandstabelle um den Faktor 10 erhöht, um diese stärker zu gewichten.

Es wurde eine Vielzahl von Rechnungen mit unterschiedlicher Anzahl von Iterationsschritten, anderen Werten in den Tabellen und Veränderungen in den genannten Fixierungen durchgeführt, die jedoch meistens zu einem Verlust der Sekundärstruktur des Ras-Proteins führten. Für das beste Ergebnis der Komplexstruktur von Ras(T35A)·GppNHp mit Cu^{2+} -Cyclen wurden 1000 Strukturen im *rigid body docking* berechnet. Die besten 200 Strukturen daraus wurden im *semi flexible annealing* verbessert und einer abschließenden Wasserverfeinerung unterzogen.

Das Ergebnis dieser Rechnungen, die energetisch günstigste Struktur, ist in Abbildung 4.4.1 in der *Ribbon-Plot*-Darstellung und in der Oberflächendarstellung für das Protein gezeigt, wobei das Nukleotid und das Cu^{2+} -Cyclen jeweils in „*Ball & Stick*“-Darstellung hervorgehoben sind.

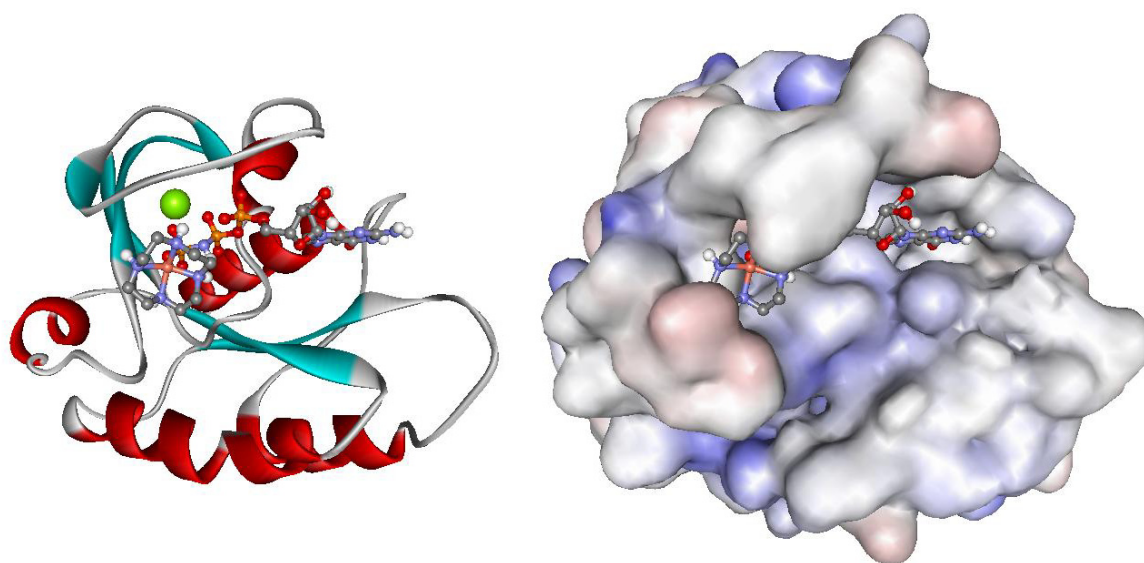


Abb. 4.4.1: *Ribbon-Plot*-Darstellung (rechts) und Oberflächendarstellung (links) des Ergebnis der HADDOCK-Rechnungen. Das Mg(II) -Ion ist in grün dargestellt. Das Nukleotid und das Cu^{2+} -Cyclen ist in „*Ball & Stick*“-Darstellung in einem 45° -Winkel perspektivisch abgebildet. Bei der Oberflächendarstellung (links) sind die Regionen mit negativer Oberflächenladung rot, die mit positiver blau dargestellt.

Für eine genauere Bestimmung der Qualität der berechneten Struktur wurde diese mit der Kristallstruktur von Ras(wt)·GppNHp (Pai *et al.* 1990) überlagert (**Abb. 4.4.2**). Für die Überlagerung wurde eine *Backbone*-Überlagerung mit dem

Programm Molmol durchgeführt (RMSD-Wert = 1.2 Å), wobei die Aminosäuren 9-11, 50-54, 80-88, 100, 118-136 und 150-159 überlagert wurden. Diese Aminosäuren wurden ausgewählt, da sie in den 2D-NMR-Bindungsuntersuchungen weder Änderungen in der Signalintensität (siehe Kapitel 4.3.4.2), noch in den chemischen Verschiebungen (siehe Kapitel 4.3.4.3) zeigten.

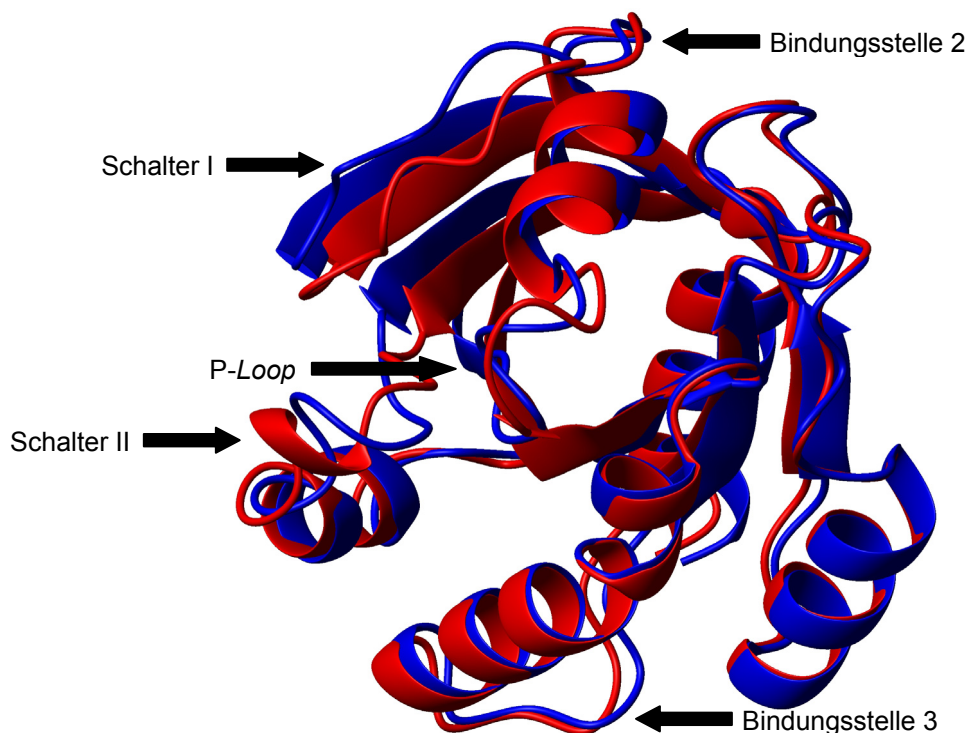


Abb. 4.4.2: In einer *Ribbon-Plot*-Darstellung sind die berechnete Cu²⁺-Cyclen-Ras(T35A)-GppNHp-Komplexstruktur (blau) und die Kristallstruktur von Ras(wt)-GppNHp (rot, Pai *et al.* 1990) übereinandergelegt. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind der P-Loop, die Schalter I und II Regionen und die postulierten zwei weiteren Bindungsstellen. Der berechnete RMSD-Wert zwischen beiden Strukturen beträgt 1.2 Å.

Dabei ist zu erkennen, dass sich die stärksten Änderungen des Proteinrückgrats in den Bereichen um die drei postulierten Bindungsstellen herum befinden.

Im Vergleich der Oberflächendarstellungen der beiden Strukturen (**Abb. 4.4.3**) fällt auf, dass vor allem die Bereiche um die zwei Aminosäuren Tyr32 (Schalter I Region) und Glu63 (Schalter II Region) herum stark durch die Bindung des Cyclens beeinflusst werden. Vor allem das Tyr32 scheint dabei durch das gebundenen Cyclen aus seiner Lage nahe der Nukleotidphosphate verdrängt worden zu sein.

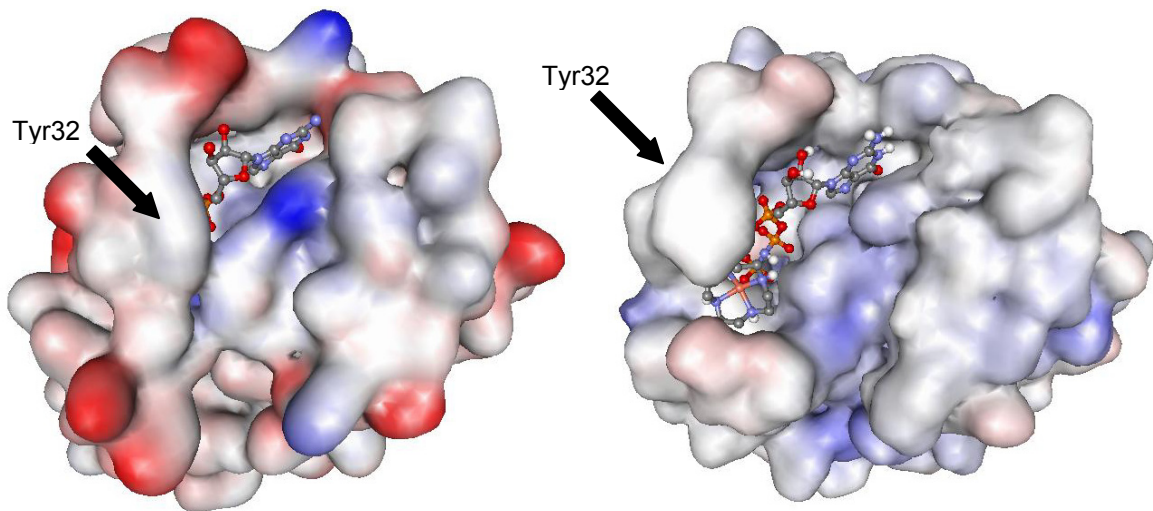


Abb. 4.4.3: Oberflächendarstellung der Struktur von Ras(wt)-GppNHp (links, Pai *et al.* 1990) und der berechneten Cu^{2+} -Cyclen-Ras(T35A)-GppNHp-Komplexstruktur (rechts). Das Nukleotid und das Cu^{2+} -Cyclen sind jeweils in „Ball & Stick“-Darstellung in einem 45° Winkel perspektivisch abgebildet. Bei den Oberflächendarstellungen sind die Regionen mit negativer Oberflächenladung rot, die mit positiver blau dargestellt.

In dem Ausschnitt der Bindungsstelle 1 des Cu^{2+} -Cyclens aus der berechneten Komplexstruktur (**Abb. 4.4.4**) ist zu erkennen, dass das Cu(II) -Ion am äußersten Ende des Nukleotids in der Nähe des γ -Phosphats bindet. Dabei konnten vier mögliche Wasserstoffbrückenbindungen zu Carbonylsauerstoffatomen identifiziert werden. Diese werden durch die vier Aminprotonen des Cyclengrundkörpers zu den Carbonylsauerstoffatomen der Aminosäuren Gly12 (NH-CO-Abstand = 2.3 Å), Asp33 (NH-CO-Abstand = 2.0 Å), Ala35 (NH-CO-Abstand = 2.4 Å) und Ala59 (NH-CO-Abstand = 2.1 Å) ausgebildet. Außerdem ist zu erkennen, dass das Cu(II) -Ion am äußersten Ende des Nukleotids in der Nähe des γ -Phosphats bindet. Aus der Komplexstruktur geht hervor, dass die Bindungsstelle in zwei Richtungen geöffnet ist. Die eine Öffnung ist der postulierte Phosphat-Austrittskanal, die Andere liegt entlang der Nukleotidbindetasche in Richtung der Nukleotidbase. Die berechnete Struktur des Cu^{2+} -Cyclen-Ras(T35A)-Komplexes ist im Bereich der Bindungsstelle 1 der veröffentlichten Struktur von Ras(G60A) (Ford *et al.* 2005) sehr ähnlich, die ebenfalls in der offenen Konformation des Zustands 1 vorliegt.

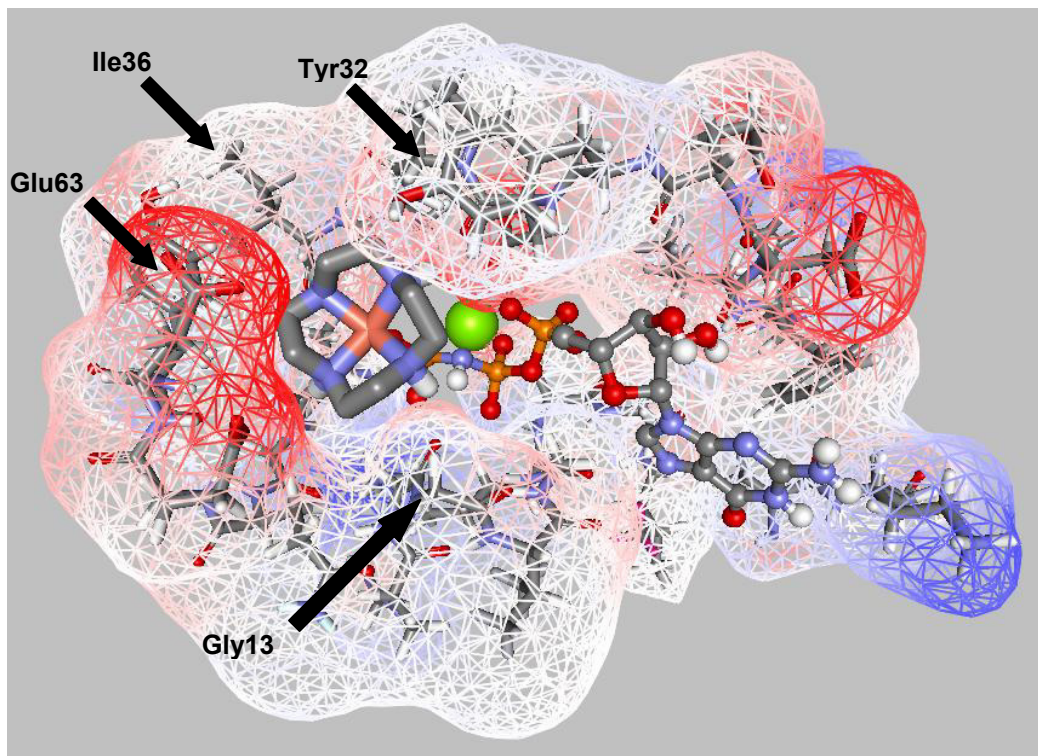


Abb. 4.4.4: Darstellung der Bindungsregion von Cu²⁺-Cyclen im Komplex mit Ras(T35A)-GppNHp. Das Nukleotid ist in „Ball & Stick“-Darstellung abgebildet. Die Aminosäuren im Bereich der Bindungsstelle und das Cu²⁺-Cyclen sind in der „Stick“-Darstellung abgebildet. Die Oberfläche der Bindungsregion ist in Maschenform dargestellt. Dabei sind die Regionen mit negativer Oberflächenladung rot, die mit positiver blau abgebildet.

4.5 Synthese der Verbindungen

4.5.1 Auswahl der Zielmoleküle

Zur Untersuchung und Steigerung der Bindungsaffinität zum Ras-Protein wurde Zn^{2+} -Cyclen mit verschiedenen Substituenten derivatisiert. Da die Bindungsexperimente unter physiologischen oder zumindest körpernahen Bedingungen durchgeführt werden sollten, wurde bei allen Cyclenderivaten, im Gegensatz zu dem in der Literatur häufig verwendeten Perchlorat-Gegenion, ZnCl_2 zur Komplexbildung benutzt.

Eine erste Zielstruktur ergab sich aus der Überlegung, die Bindung auch mittels Fluoreszenzspektroskopie analysieren zu können. Da eine Methode zur Untersuchung mit Ras-Mant-Nukleotid-Komplexen etabliert und bereits einige Bindungsstudien durchgeführt wurden, wurde der Fluoreszenzfarbstoff 2-Methylamino-benzoesäure (Mant) für die Markierung des Cyclens ausgewählt. Dazu wurde das Mant mit dem Cyclen über einen Ethylenamin-*Spacer* verbunden (**Abb. 4.5.1**).

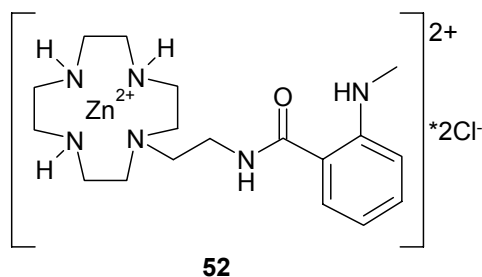


Abb. 4.5.1: Cyclenderivat mit Mant über einen Ethylenamin-*Spacer* gebunden.

Aufgrund von Vorüberlegungen, die auf den Ergebnissen der MD-Rechnungen basieren und mit Hilfe der dabei errechneten Ras-Cyclen-Komplexstruktur wurden vielversprechende Derivatstrukturen erarbeitet. Dabei zeigte sich, dass Dipeptide, die über einen Ethylenamin-*Spacer* (**Abb. 4.5.2**) bzw. einen Acetyl-*Spacer* (**Abb. 4.5.3**) mit dem Cyclengrundkörper verbunden sind, geeignete Zielstrukturen darstellen.

Aufgrund potentieller Wechselwirkungen mit apolaren Bereichen des Proteins (z.B. dem P-Loop) wurden Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten als erster

Teil, gefolgt von einer polaren Aminosäure bevorzugt. Um den Einfluss von sterischen Hinderungen beurteilen zu können, wurde eine räumlich große Seitenkette wie in Valin bzw. kleine Seitenkette wie in Alanin ausgewählt.

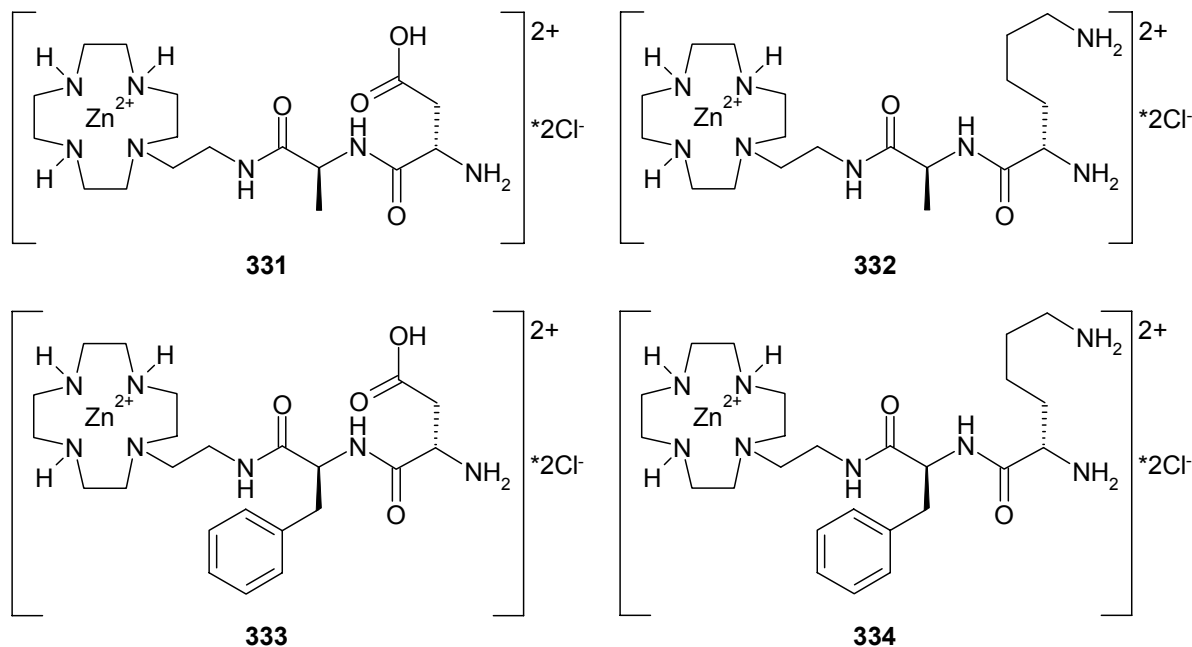


Abb. 4.5.2: Cyclenderivate, die Dipeptide über einen Ethylenamin-Spacer gebunden haben.

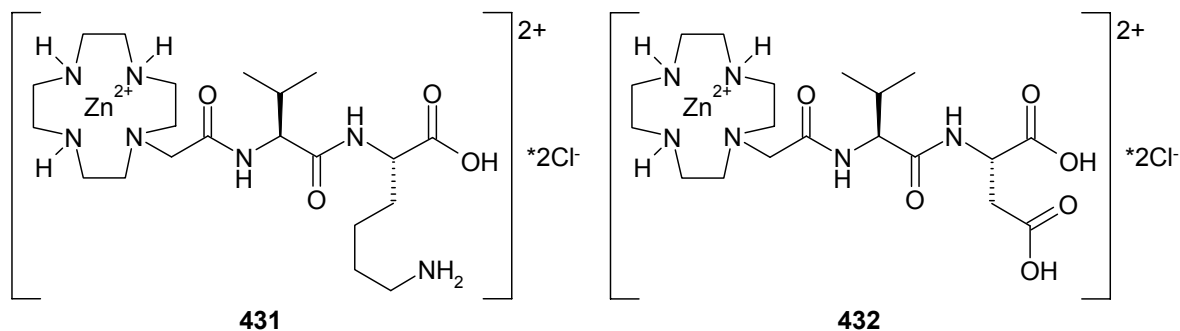


Abb. 4.5.3: Cyclenderivate, die Dipeptide über einen Acetyl-Spacer gebunden haben.

Zudem erschien die aromatische Seitenkette des Phenylalanins als geeignet, um mögliche Wechselwirkungen mit dem Tyr32 des Ras-Proteins eingehen zu können. Als zweite Aminosäuren des Dipeptids wurde sowohl die bei neutralem pH-Wert negativ geladene Asparaginsäure, als auch das positiv geladene Lysin verwendet, um sowohl negativ als auch positiv geladene Seitengruppen am Cyclen einzuführen. Diese können mögliche Wechselwirkungen mit den geladenen Regionen im Bereich der Nukleotidbase eingehen. Zur Veranschaulichung dieser Überlegungen ist die Bindungsstelle 1 aus dem Ergebnis der MD-Rechnung (Kapitel 4.4) in der Oberflächendarstellung abgebildet (**Abb. 4.5.4**).

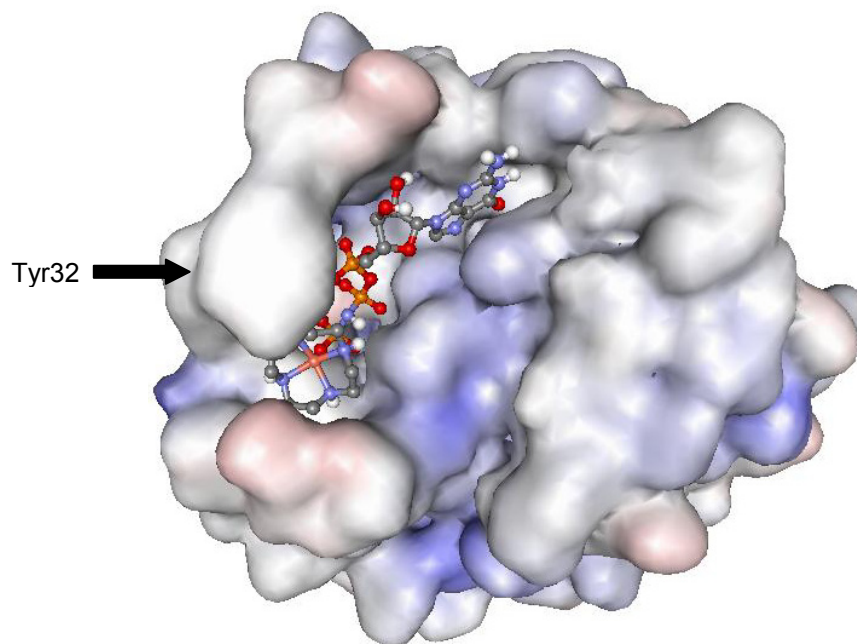


Abb. 4.5.4: Ergebnis der MD-Rechnung mit HADDOCK: Oberflächendarstellung der berechneten Struktur von Ras(T35A)-GppNHp im Komplex mit Cu²⁺-Cyclen nach dem *Refinement* in Wasser. In „Ball & Stick“-Darstellung sind das Cu²⁺-Cyclen (links unten) und das Nukleotid (zentral), in blau die Bereiche mit positiven und in rot die mit negativen Oberflächenladungen abgebildet.

4.5.2 Synthese der Verbindungen ohne Aminosäurereste

Für die Monosubstitution wurde das Cyclen zunächst nach einer literaturbekannten Methode (Brandes *et al.* 1996) mit 2,2-Dimethyl-propionsäureanhydrid (Boc-Anhydrid) zum dreifach geschützten Cyclenderivat **1** umgesetzt. Das dementsprechend geschützte Cyclen wurde daraufhin mit 2-Brom-methylacetat zu **2** umgesetzt und anschließend mit LiOH zu **3** verseift (Jeon *et al.* 2002). Nach der Literatur-bekannten Vorschrift von Reichenbach-Klinke *et al.* (2002) wurde das dreifach geschützte Cyclen mit Bromacetonitril zu **4** umgesetzt und mit Raney-Nickel zu **5** reduziert. Die beiden Verbindungen **3** und **5** dienen als Edukte für die nachfolgenden aufgeführten Peptidkupplungen.

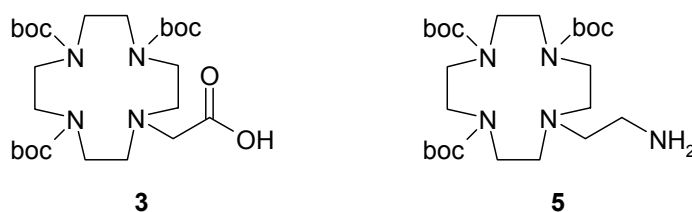


Abb. 4.5.5: Abbildung der beiden Ausgangsverbindungen **3** und **5**.

Um den Einfluss kleiner Substituenten auf das Bindungsverhalten von Zn^{2+} -Cyclen testen zu können, wurden die beiden Verbindungen **3** und **5** zunächst mit 1 ml HCl-gesättigtem Diethylether pro 0.15 mmol Boc-Schutzgruppe bei RT entschützt. Dabei fiel auf, dass nach der Zugabe des HCl-gesättigten Diethylethers zunächst beide Verbindungen in Lösung blieben und sich jeweils erst nach ca. 30 Minuten ein Niederschlag bildete. Die ausgefallenen Hydrochloridsalze **13** und **15** konnten ohne große Aufreinigung weiter umgesetzt werden. Die Verbindung **15** ist bereits von Koike *et al.* (1996) synthetisiert worden. Dabei wurde jedoch nicht das Cyclen als Ausgangssubstanz verwendet, sondern das 2,6-diketo-1,4,7,10-tetraaza-cyclododecan, das zunächst mit Bromacetonitril umgesetzt und anschließend mit BH_3 in THF reduziert wurde.

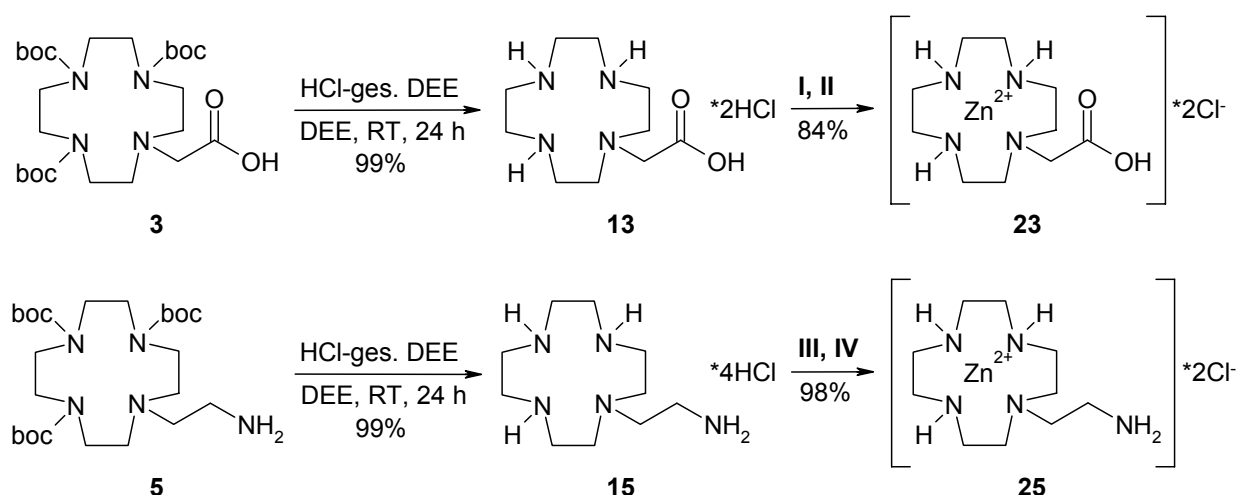


Abb. 4.5.6: Darstellung der beiden Hydrochloridsalze **13** und **15** und die folgende Komplexierung mit 1.5 eq. ZnCl₂ zu **23** und **25** ((I) 2 eq. NaOH, H₂O, RT; (II) 1.5 eq. ZnCl₂, MeOH, RT, 2 h; RF, 10 h; (III) 9 eq. Ionenaustauscher III, H₂O, RT; (IV) 1.5 eq. ZnCl₂, MeOH, RT, 1 h; RF, 10 h).

Das Hydrochloridsalz **13** wurde vor der Zugabe des Zn(II)-chlorids mit Hilfe von wässriger 1 M NaOH-Lösung neutralisiert, um eine möglichst vollständige Komplexierung mit Zn(II) zu erreichen. Bei der Darstellung des Cyclenderivats **25** wurden die Amine mittels eines stark basischen Ionenaustauschers deprotoniert und das neutrale Amin mit ZnCl₂ komplexiert. Die Verbindung **25** ist ebenfalls in der Literatur (Koike *et al.* 1996) aufgeführt, jedoch wurde zur Komplexierung des Cyclenderivats Zn(ClO₄)₂ benutzt.

4.5.3 Synthese des Mant-markierten Zn²⁺-Cyclen

Zur weiteren Untersuchung der Bindungsstellen mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde das Mant-EA-Zn(II)-Cyclen (**52**) ausgehend von Verbindung **5** mit Hilfe des Mantanhydrids synthetisiert (**Abb. 4.5.7**).

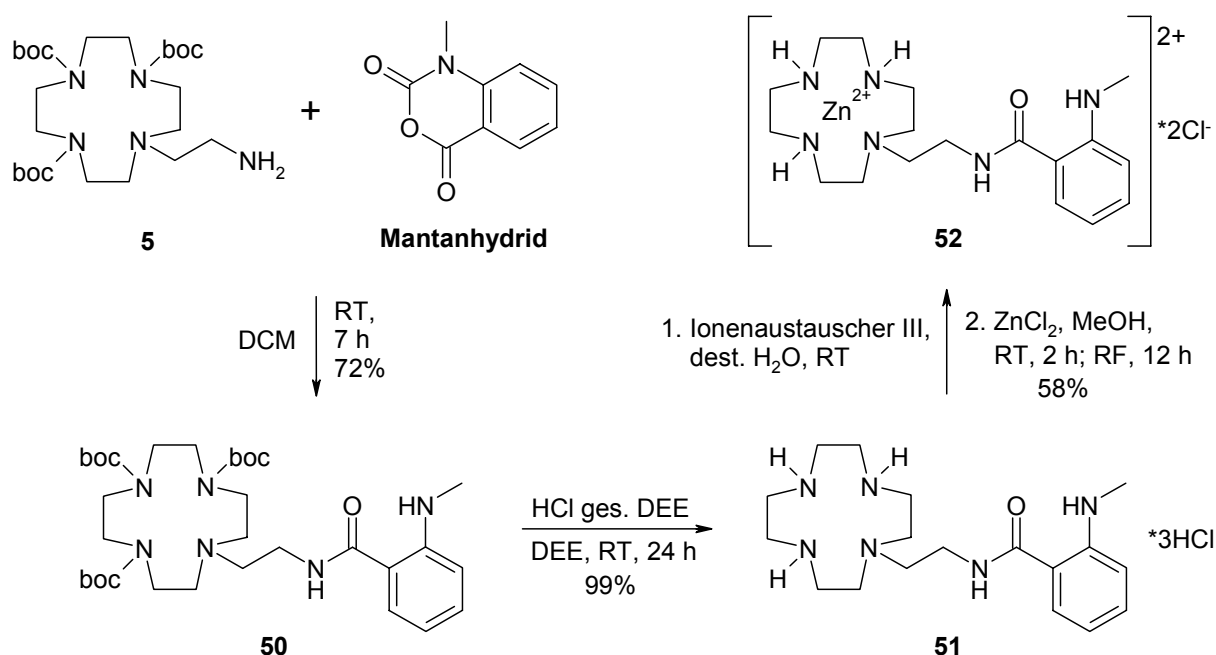


Abb. 4.5.7: Darstellung der Verbindung **52** aus **5** mit Mantonhydrid.

Dabei konnte auf die Standardreagenzien für Peptidkupplungen (wie HOBt und HBTU) verzichtet werden, da die 2-Methylaminobenzoesäure bereits als Anhydrid aktiviert vorliegt und zur Verbesserung der Reaktivität nicht mehr in den Aktivester überführt werden musste. Die Umsetzung erfolgte in Dichlormethan bei Raumtemperatur. Die anschließende Aufreinigung gestaltete sich aufwendiger als erwartet, da das Mantonhydrid und das Boc₃-Cyclen-EA-Mant sehr ähnliche R_F-Werte bei DC-Untersuchungen aufwiesen. Dadurch konnte das Produkt **50** erst nach drei säulenchromatographischen Reinigungsschritten an Kieselgel mit verschiedenen Laufmitteln in einer Ausbeute von 72% erhalten werden. Die weitere Umsetzung von **50** zum gewünschten Endprodukt **52** erfolgte, wie schon unter Kapitel 4.5.2 beschrieben. Dazu wurden zunächst die Boc-Schutzgruppen mittels HCl-gesättigtem Diethylether bei Raumtemperatur abgespalten, die dabei entstandenen sekundären Ammoniumionen über einen stark basischen Ionenaustauscher deprotoniert und das neutrale Cyclenderivat mit Zn(II)-chlorid umgesetzt. Nach einer Umkristallisation in einem Methanol/Ethanol-Gemisch konnte das Produkt **52** als fahl gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 58% isoliert werden.

4.5.4 Synthese der Verbindungen mit einer Aminosäure als Rest

Die Synthesen der einzelnen Cyclenderivate mit Ethylenamin-*Spacer* erfolgte, wie in Abbildung 4.5.8 gezeigt, unter Anwendung der orthogonalen Schutzgruppen Strategie mit Fmoc-geschützten Aminosäuren. Als Edukt diente das Boc₃-Cyc-EA (**5**), das nach der Vorschrift von Reichenbach-Klinke *et al.* (2002) synthetisiert wurde.

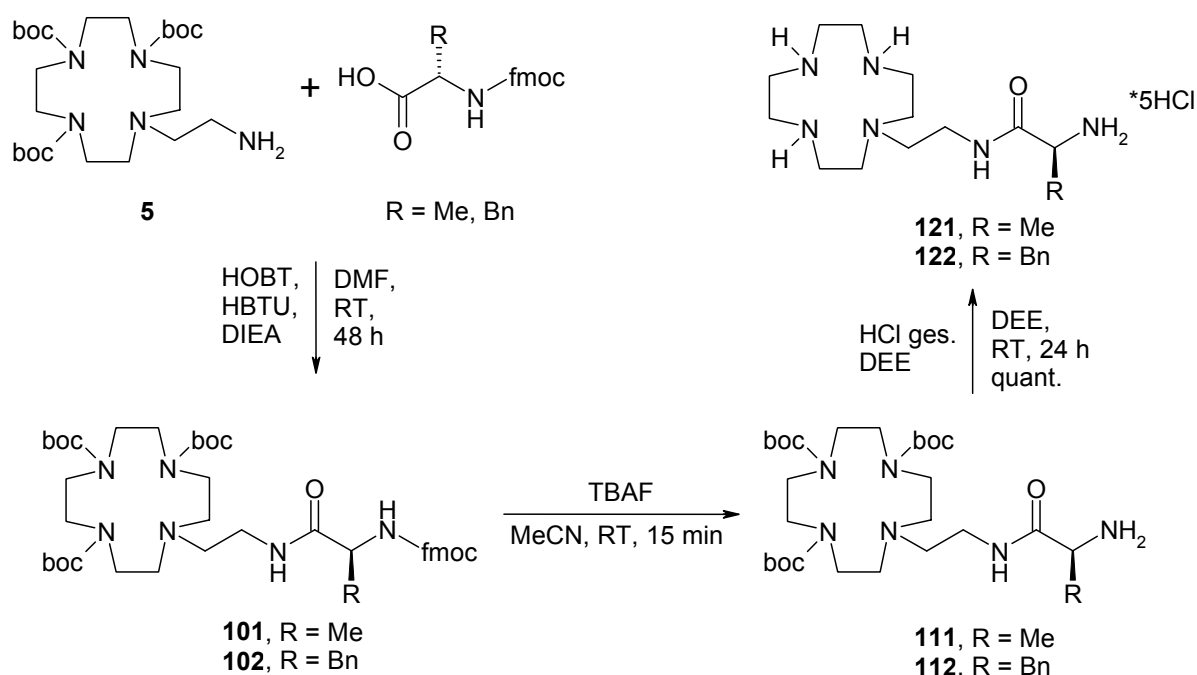


Abb. 4.5.8: Darstellung der beiden Hydrochloridsalze **121** und **122** aus **5**.

Die Umsetzungen von **5** mit den beiden Fmoc-geschützten Aminosäuren L-Alanin und L-Phenylalanin und die Entschützungen der Fmoc-Gruppe mit Hilfe von TBAF Trihydrat zu **111** und **112** sind ebenfalls in der Literatur beschrieben (Ritter *et al.* 2005). Die anschließende Entschätzung der Boc-Schutzgruppen erfolgte mit Hilfe von HCl-gesättigtem Diethylether in abs. Diethylether mit quantitativen Ausbeuten. Zur weiteren Umsetzung wurden die beiden Hydrochlorid-Salze **121** und **122** mit wässriger 1 M NaOH-Lösung in Methanol neutralisiert und mit Zn(II)-chlorid komplexiert. Die beiden Endprodukte **131** und **132** (**Abb. 4.5.9**) wurden, nach einer Umkristallisation in einem Methanol/Ethanol-Gemisch, als Chloridsalze in Ausbeuten von 40% bzw. 65% erhalten.

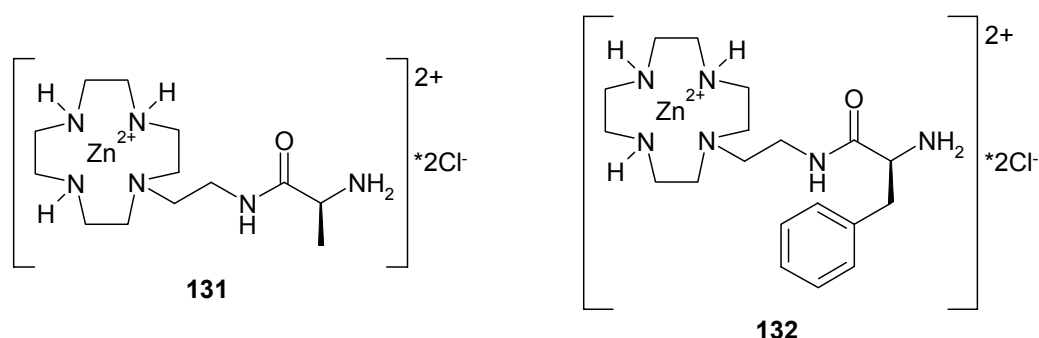


Abb. 4.5.9: Abbildung der beiden Produkte **131** und **132**.

Zur Identifikation der Stereozentren wurden die Drehwerte der beiden Verbindungen in Methanol bei 20°C gemessen. Aus diesen Messungen geht hervor, dass beide Verbindungen einen positiven Drehwert $[\alpha]_D^{20}$ von +4.0° für Verbindung **131** und +21.0° für Verbindung **132** aufweisen und somit nicht racemisch vorliegen.

Um ein weiteres Spektrum von Substanzen untersuchen zu können, die eine Aminosäure über einen Linker an das Cyclen gebunden haben, wurden die Aminosäuren L-Valin und Glycin direkt an den Acetyl-Spacer des Cyclenderivat **3** gekuppelt. Dazu wurden die Ammoniumchloridsalze der beiden Aminosäuren als Methylester geschützt eingesetzt (**Abb. 4.5.10**).

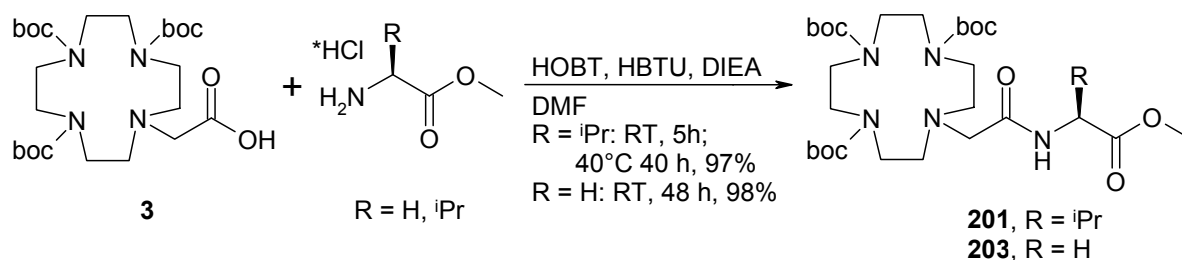


Abb. 4.5.10: Umsetzung von **3** mit L-Val-OMe·HCl und Gly-OMe·HCl zu **201** bzw. **203**.

Die Aufreinigung der beiden Produkte **201** und **203** erfolgte jeweils mit Hilfe einer Kieselgelsäule und Laufmittelgemischen aus Petrolether und Essigester in sehr guten Ausbeuten von 97% bzw. 98%. Für die weitere Umsetzung wurde zunächst der Methylester mit jeweils 1.3 eq. Lithiumhydroxid-Monohydrat verseift (siehe **Abb. 4.5.11**). Die Verbindung **211** konnte ohne zusätzliche Aufreinigung weiter umgesetzt werden, wohingegen die Verbindung **213**, wegen der geänderten Wahl des Lösungsmittels, nach der Verseifung säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem polaren Laufmittelgemisch aus DCM/MeOH 9:1 gereinigt werden musste.

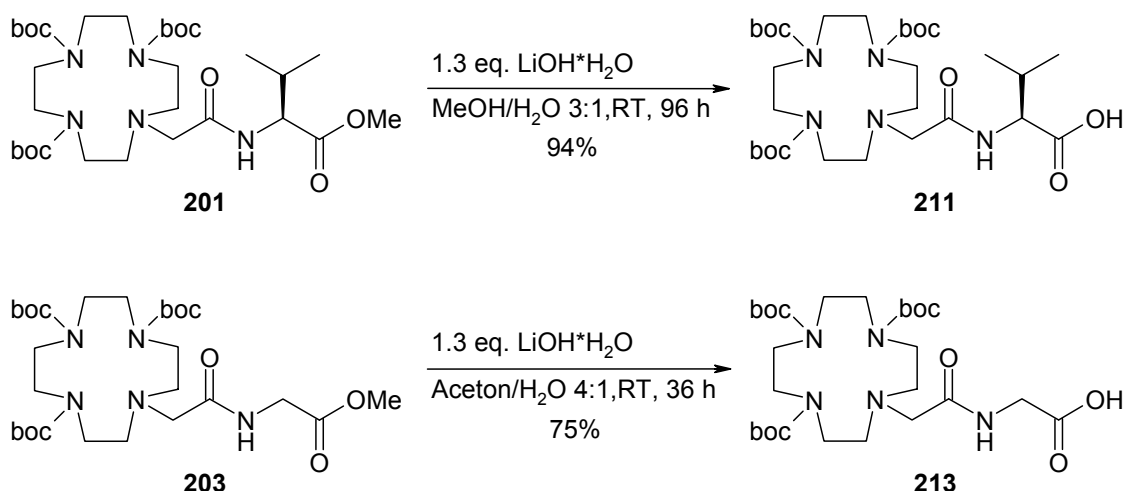


Abb. 4.5.11: Synthese der beiden Verbindungen **211** und **213**.

Anschließend wurden die Boc-Schutzgruppen, wie in **Abb. 4.5.12** gezeigt, mit HCl-gesättigtem Diethylether abgespalten, die entstandenen Ammoniumsalze mit wässriger 1 M NaOH-Lösung neutralisiert und die Cyclenderivate mit ZnCl₂ komplexiert. Nach einer Umkristallisation in Methanol/Ethanol konnten die beiden Zn(II)-Komplexe **231** und **233** in 80% bzw. 90% isoliert werden.

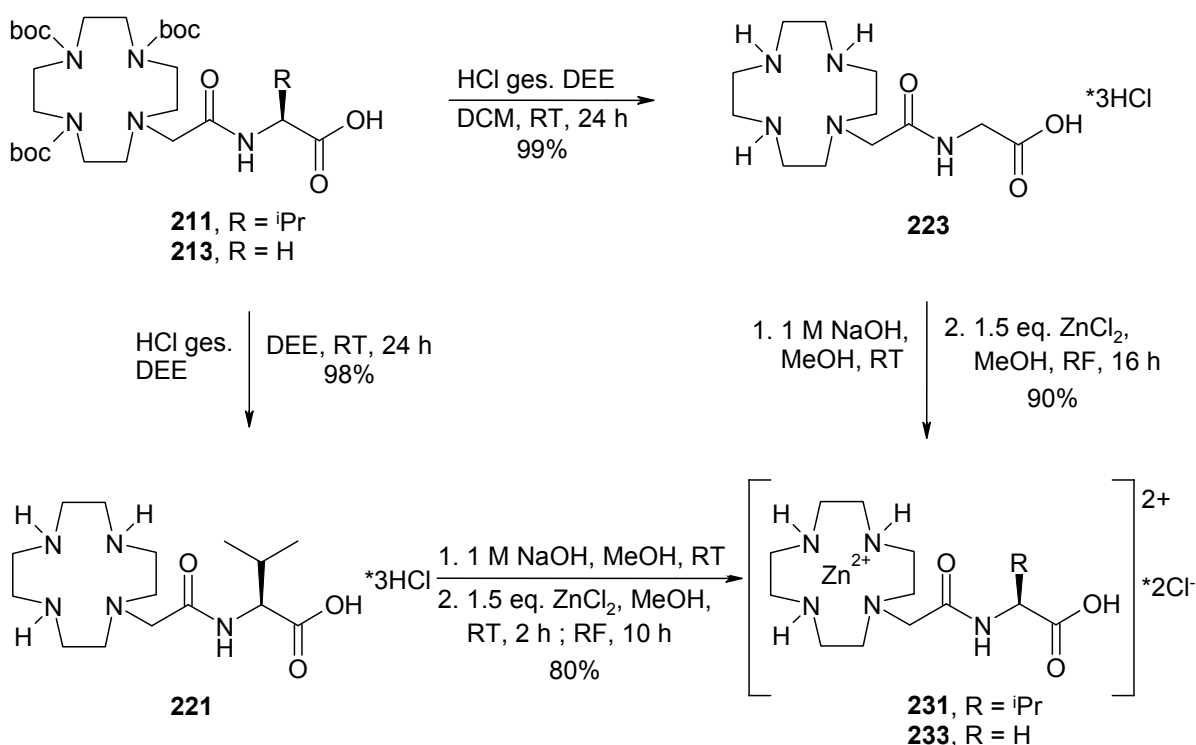


Abb. 4.5.12: Darstellung der beiden Zn²⁺-Cyclenderivate **231** bzw. **233** aus **211** bzw. **213**.

Auch hier wurde die chirale Verbindung **231** auf ihren optischen Drehwert hin untersucht, der bei 20°C in Methanol einen negativen Drehwert von -4.6° aufweist und somit zeigt, dass die Verbindung ebenfalls nicht racemisch vorliegt.

4.5.5 Synthese der Dipeptid-Derivate

Wie in Kapitel 4.5.1 erwähnt, wurden als zweite Aminosäuren des Cyclen-Dipeptids sowohl L-Asparaginsäure, als auch L-Lysin gewählt. Als Edukte wurden hierfür sowohl die Cyclen-Aminosäuren mit dem Ethylenamin-*Spacer* (**111** und **112**, Ritter *et al.* 2005), als auch das Boc₃-Cyc-Ac-Val-OH mit dem Acetyl-*Spacer* (**211**) jeweils als dreifach Boc-geschützte Verbindungen eingesetzt.

Für die Synthese der Asparaginsäurederivate (**Abb. 4.5.13**) von **111** und **112** wurde L-Asparaginsäure als N-Boc-geschützte Verbindung eingesetzt, um nach der Entschützung des Benzylesters in der Seitengruppe in einem einzigen Reaktionsschritt alle Boc-Schutzgruppen abspalten zu können.

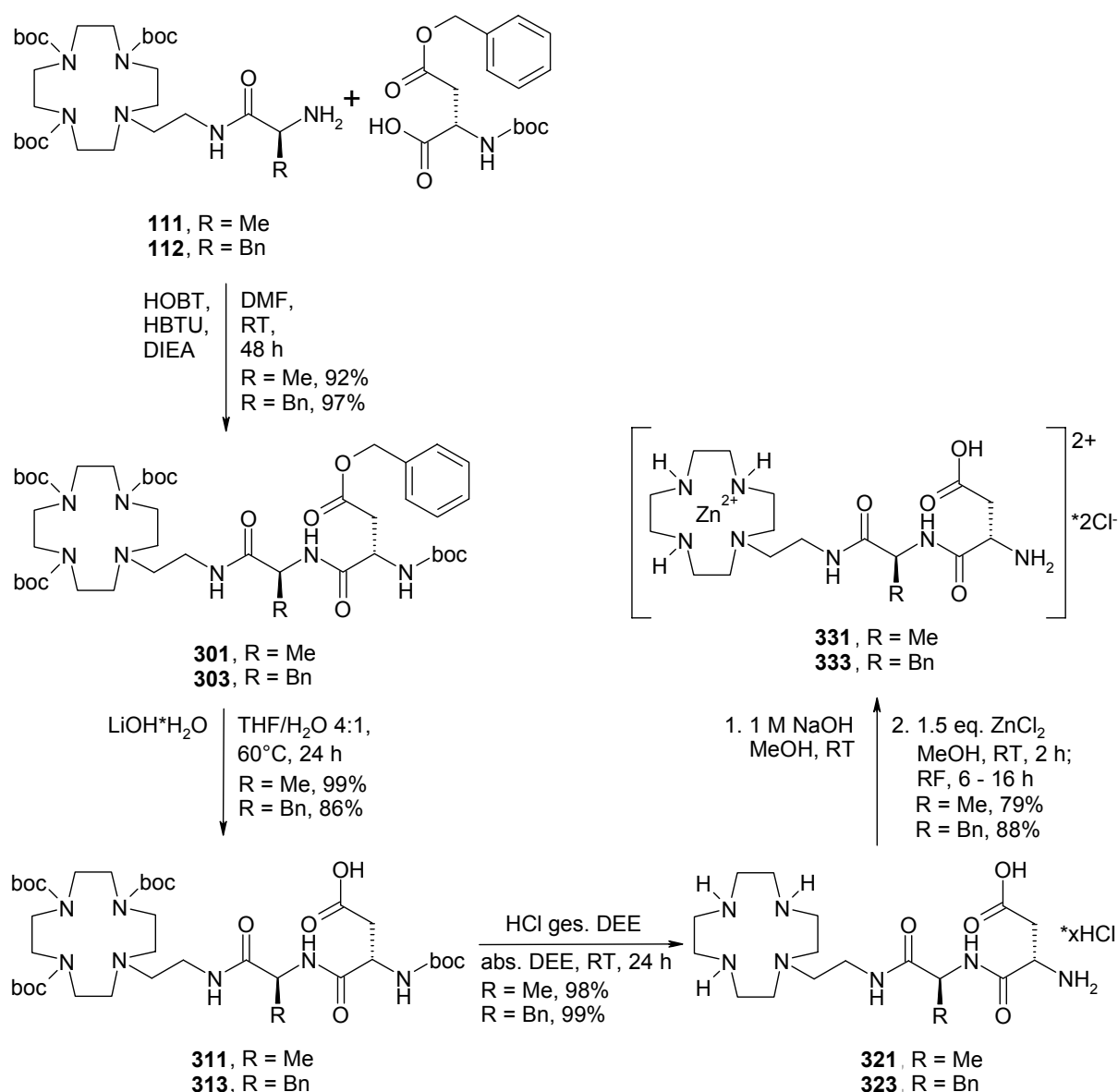


Abb. 4.5.13: Darstellung der beiden Zn²⁺-Cyclenderivate **331** bzw. **333** aus **111** bzw. **112**.

Die beiden geschützten Cyclen-Asparaginsäure-Derivate **301** und **303** wurden mit Hilfe von Standardreagenzien für Peptidkupplungen (HOBt, HBTU und DIEA) in DMF in einer Stickstoffatmosphäre synthetisiert. Nach einer wässrigen Aufarbeitung wurden beide Verbindungen über eine Kieselgelsäule chromatographisch mit einem DCM-MeOH-Laufmittelgemisch von 9:1 gereinigt und als farblose Feststoffe in guten Ausbeuten von 92% (**301**) und 97% (**303**) isoliert.

Zur weiteren Umsetzung wurde jeweils der Benzylester in einem THF-Wasser-Gemisch von 4:1 bei 60°C mit Lithiumhydroxid-Monohydrat abgespalten. Nach einer wässrigen Aufarbeitung mit gesättigter, wässriger Ammoniumchlorid-Lösung musste die Verbindung **313** zusätzlich an einer Kieselgelsäule chromatographisch mit einem DCM-MeOH-Laufmittelgemisch von 9:1 gereinigt werden. Dieser weitere Reinigungsschritt führte zu einer Verringerung der Ausbeute auf 86% im Vergleich zu 99% für die Verbindung **311**, die ohne weitere Aufreinigung entschützt werden konnte.

Nach der Entschützung der Benzylester wurden die Boc-Schutzgruppen mit Hilfe von HCl-gesättigtem Diethylether bei RT abgespalten und die entstandenen Hydrochloridsalze **321** und **323** ohne weitere Reinigung umgesetzt. Dazu wurden beide Verbindungen zunächst mit wässriger 1 M NaOH-Lösung bei RT neutralisiert und anschließend mit 1.5 Äquivalenten an ZnCl_2 in Methanol unter Rückfluss komplexiert. Die so entstandenen Zn(II)-Komplexe **331** und **333** konnten nach Umkristallisation in Methanol/Ethanol als farblose Feststoffe in Ausbeuten von 79% bzw. 88% erhalten werden.

Aus den NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Verbindungen konnte festgestellt werden, dass die Verbindung **331** nicht mehr in der isomerenreinen Form vorliegt, da die Methylgruppe des Alanins (Dublett-Aufspaltung durch das H_α -Proton) im ^1H -NMR-Spektrum in zwei Dubletts aufgespalten ist. Zudem liegen auch die beiden H_β -Protonen des Aspartatrests in zwei Dubletts aufgespalten vor. Dagegen weist die Verbindung **333** in den NMR-Spektren keinerlei Anzeichen für eine Isomerisierung auf. Hier sind die H_β -Protonen des Phenylalaninrests und ebenso die des Aspartatrests in jeweils ein Dublett aufgespalten.

Die Synthese der Lysinderivate wurde ausgehend von den Verbindungen **111** und **112** unter Verwendung von zweifach N-Boc-geschütztem L-Lysin als Dicyclohexylammoniumsalz durchgeführt. Das Boc-L-Lys(Boc)-OH wurde eingesetzt, um nach der Aufreinigung in einer einzigen Reaktion alle Schutzgruppen abspalten zu

können (**Abb. 4.5.14**).

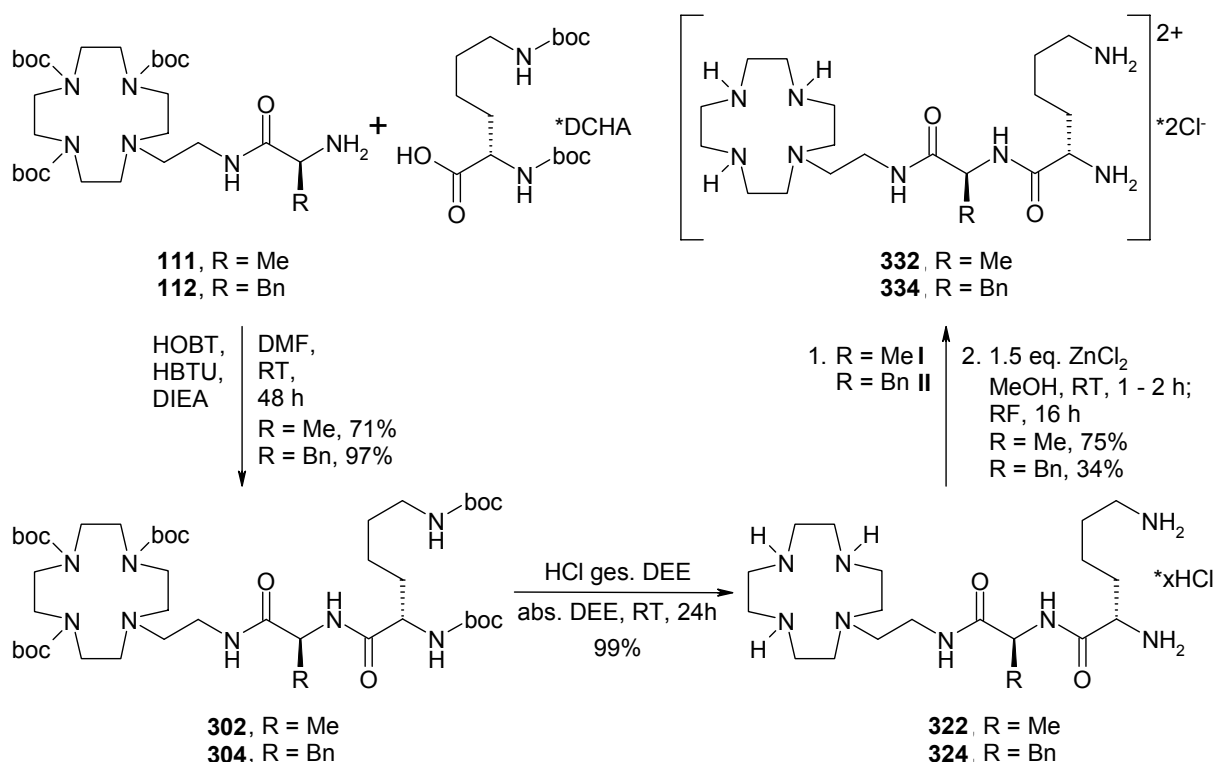


Abb. 4.5.14: Darstellung der beiden Zn²⁺-Cyclenderivate **332** bzw. **334** aus **111** bzw. **112** (**I**) 1 M NaOH, MeOH, RT; (**II**) 9 eq. Ionenaustauscher III, H₂O, RT).

Um die beiden Boc-geschützten Cyclenderivate **302** und **304** zu synthetisieren, wurden ebenfalls Standardreagenzien für Peptidkupplungen und die gleichen Reaktionsbedingungen wie für **301** und **303** verwendet. Auch die wässrige Aufarbeitung mit gesättigter wässriger NH₄Cl-Lösung wurde bei beiden Verbindungen durchgeführt. Lediglich für die säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel wurde für **302** ein zusätzlicher Reinigungsschritt mit einem Ethylacetat/Petrolether-Laufmittelgemisch von 9:1 vor der Aufreinigung mit einem DCM-MeOH-Laufmittelgemisch von 9:1 durchgeführt. Deswegen konnte **302** auch nur in einer Ausbeute von 71% gewonnen werden, wo hingegen **304** in einer Ausbeute von 97% isoliert wurde.

Die Entschützung der beiden Verbindungen erfolgte mit HCl-gesättigtem Diethylether bei Raumtemperatur in nahezu quantitativen Ausbeuten. Die beiden Hydrochloridsalze **322** und **324** wurden ohne zusätzliche Reinigung weiter umgesetzt. Dazu wurde die Verbindung **322** zunächst mit wässriger 1 M NaOH-Lösung bei RT neutralisiert und anschließend mit ZnCl₂ in Methanol unter Rückfluss komplexiert. Der so entstandene Zn(II)-Komplex **332** konnte nach einer

Umkristallisation in Methanol/Ethanol als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 79% erhalten werden.

Die Verbindung **324** wurde zunächst mit Hilfe eines Ionenaustauschers III in Wasser deprotoniert und anschließend mit ZnCl_2 in Methanol unter Rückfluss umgesetzt. Aufgrund von Ausbeuteverlusten am Ionenaustauscher III, konnte Zn^{2+} -Cyclenderivat **334** nach der Umkristallisation nur in einer Ausbeute von 34% isoliert werden.

In den NMR-spektroskopischen Untersuchungen weist die Verbindung **332** keinerlei Anzeichen für eine Isomerisierung auf. Im ^1H -NMR Spektrum sind die H_β -Protonen des Alaninrests durch das H_α -Proton in ein Dublett aufgespalten. Zudem weisen sowohl das H_α -Proton des Alanins als auch das H_α -Proton des Lysins jeweils nur ein Signal im ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum auf. Die Verbindung **334** dagegen weist zwei unterschiedlich intensive Signale im ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum für das H_α -Proton des Phenylalanins auf und bestätigt somit eine teilweise Racemisierung des Phenylalaninrests. Der Lysinrest ist jedoch nicht von einer Racemisierung betroffen und zeigt lediglich ein Signal im ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum. Ausgehend von der Verbindung **211** wurden das Lysinderivat **431** (**Abb. 4.3.15**) und das Asparaginsäurederivat **432** (**Abb. 4.3.15**) mit Hilfe von Standardreagenzien für Peptidkupplungen synthetisiert. Als Aminosäuren wurden der Methylester des in der Seitenkette Boc-geschützten L-Lysin-Hydrochloridsalzes und der di-*tert*-Butylester des L-Asparaginsäure-Hydrochlorids eingesetzt. Die Aufarbeitung der Reaktionen erfolgte jeweils in wässriger, halbgesättigter NaHCO_3 -Lösung mit einer anschließenden säulenchromatographischen Aufreinigung an Kieselgel unter Verwendung eines DCM/MeOH-Laufmittelgemisches von 9:1 für die Verbindung **401** und eines EE/PE-Laufmittelgemisches von 9:1 für die Verbindung **402**. Die Verbindungen konnten jeweils als farbloser Feststoff in guten Ausbeuten von 85% (**401**) bzw. 82% (**402**) isoliert werden.

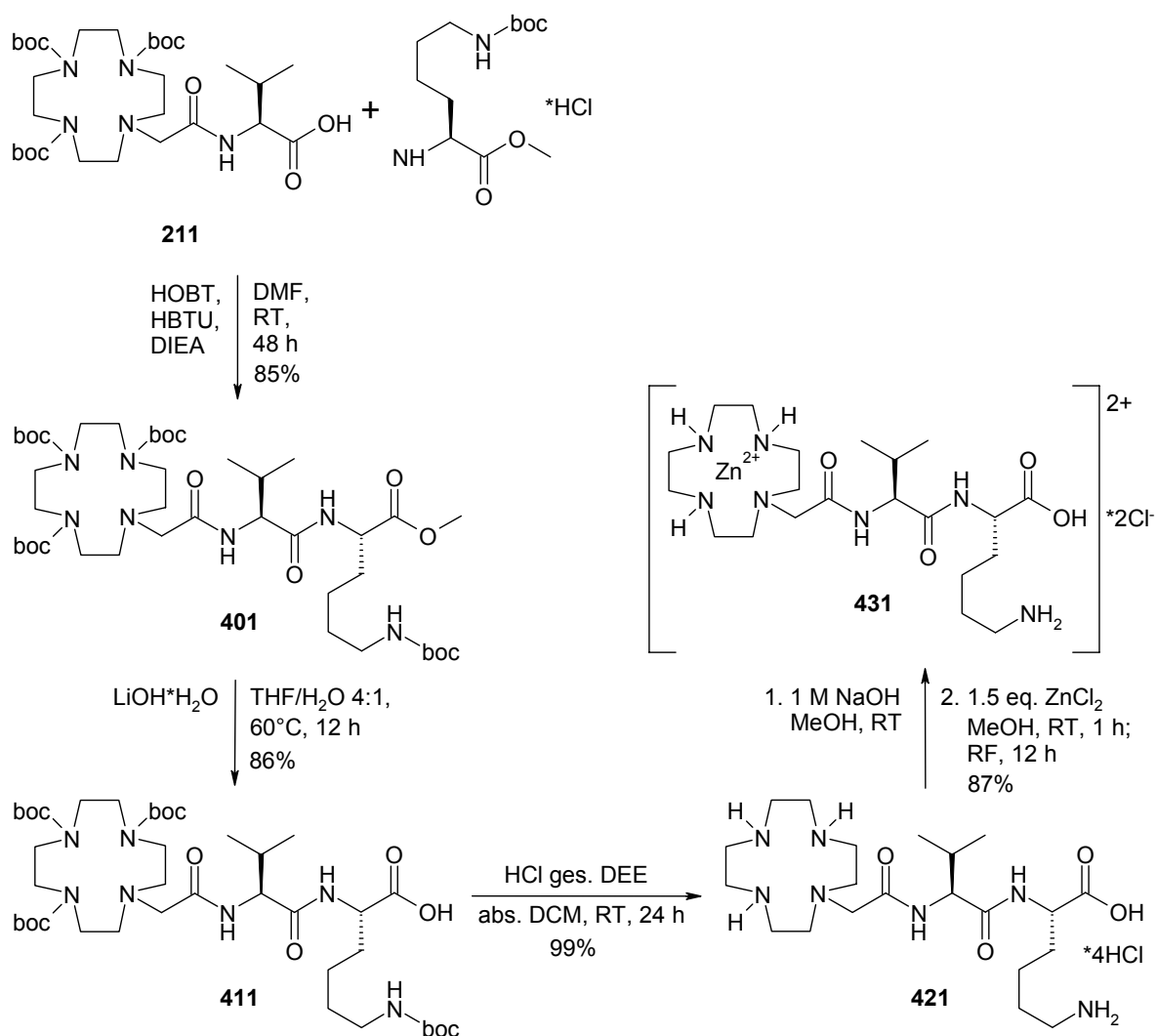


Abb. 4.5.15: Darstellung des Zn²⁺-Cyclenderivates **431** aus **211**.

Die Entschützung der Ester erfolgte für beide Verbindungen (**401** und **402**) mit LiOH·H₂O in einem THF/H₂O-Gemisch von 4:1 bei 60°C. Nach einer anschließenden säulenchromatographischen Aufreinigung an Kieselgel mit einem DCM/MeOH-Laufmittelgradienten von 9:1 bis 3:1 konnten die freien Säuren **411** und **412** in Ausbeuten von 86% bzw. 84% erhalten werden.

Nach der bereits erläuterten Entschützung der Boc-Schutzgruppen mit HCl-gesättigtem Diethylether wurden die entstandenen Hydrochloridsalze **421** und **422** mit wässriger 1 M NaOH-Lösung in Methanol neutralisiert und mit ZnCl₂ komplexiert. Die beiden Zn²⁺-Cyclenderivate **431** und **432** konnten nach einer Umkristallisation in Ausbeuten von 87% bzw. 80% isoliert werden.

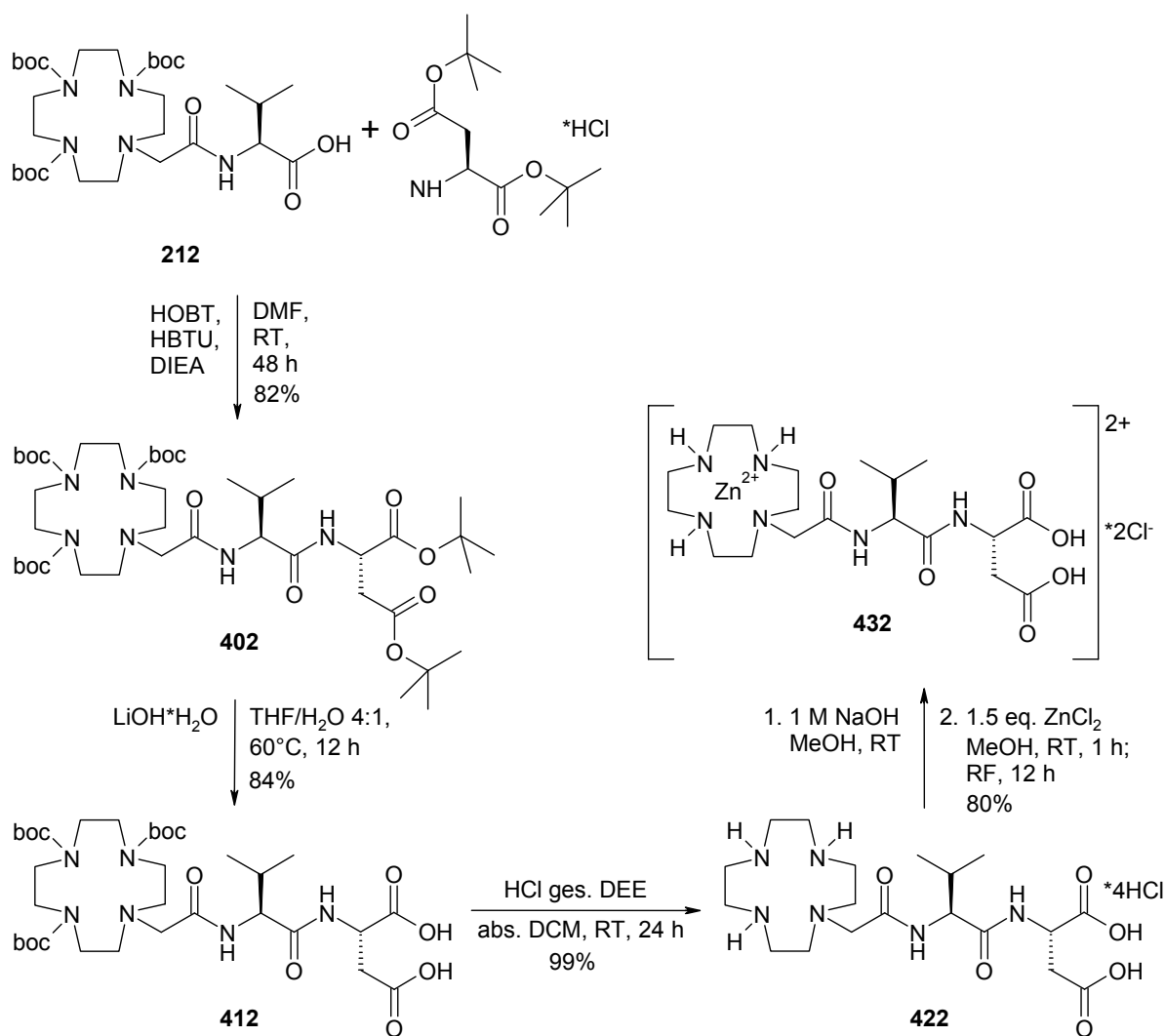


Abb. 4.5.16: Darstellung des Zn^{2+} -Cyclenderivates **432** aus **211**.

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Verbindung **431** fast vollständig racemisiert vorliegt. Sowohl das H_α -Proton des Valinrests als auch das H_α -Proton des Lysinrests zeigen nicht die erwarteten Aufspaltungen in den ^1H -NMR-Spektren. Zudem zeigt das ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum jeweils zwei Signale für diese CH-Gruppen. Dagegen weist das ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum der Verbindung **432** jeweils nur ein Signal für die H_α -Proton des Valinrests und des Aspartatrests auf und weist somit keinerlei Anzeichen für eine Isomerisierung der Verbindung **432** auf.

4.6 Untersuchung der Cyclenderivate mittels *WaterLOGSY*

4.6.1 Einführung

Es gibt zahlreiche Methoden in der NMR-Spektroskopie, um Protein-Ligand-Bindungen zu untersuchen (Fielding *et al.* 2005). Dabei stellt die *WaterLOGSY*-Methode (**Water-Ligand Observed via Gradient SpectroscopY**) eine einfache Möglichkeit dar, um die Bindung eines Liganden an ein Protein mit Einsatz geringer Probemengen qualitativ und schnell zu untersuchen.

Diese Methode (C. Dalvit 1998, Dalvit *et al.* 2001) beruht auf dem Magnetisierungstransfer von angeregten Wassermolekülen auf den Liganden. Ist der Ligand ungebunden, so besitzt dieser NOE-Transfer ein entgegengesetztes Vorzeichen gegenüber dem des an das Protein gebundenen Liganden. Der Transfer kann mittels eines Differenzspektrums sichtbar gemacht werden. Dabei erscheinen die Signale der gebundenen Liganden positiv, die der Ungebundenen negativ. Die Signale der Amin- bzw. Amidprotonen der jeweiligen Verbindungen können jedoch nicht als positives Bindungssignal ausgewertet werden, da diese sich im schnellen Austausch mit den Lösungsmittelprotonen befinden und daher immer ein positives Signal zeigen.

Ein weiterer Vorteil der Untersuchungsmethode mit *WaterLOGSY* besteht darin, dass mehrere Liganden gleichzeitig untersucht werden können, wenn die chemischen Verschiebungen der einzelnen Verbindungen bekannt sind. Dabei kann aus den Intensitätsänderungen der Resonanzsignale der einzelnen Liganden auf die relativen Bindungsaffinitäten der Liganden untereinander rückgeschlossen werden.

4.6.2 Untersuchung der Bindung von Cyclenderivaten an Ras(T35A)

Die synthetisierten Zn^{2+} -Cyclenderivate und einige andere Cyclenderivate, die am Lehrstuhl von Prof. Dr. B. König synthetisiert wurden (siehe **Abb. 4.6.1A** und

Abb. 4.6.1B), wurden mittels NMR-Spektroskopie untersucht. Bei der Untersuchung konnte mit Hilfe der *ePHOGSY*-Pulssequenz (*enhanced Protein Hydration Observed by Gradient Spectroscopy*, Dalvit *et al.* 2000) eine mögliche Bindung zwischen Liganden und Protein bestimmt werden. Als Protein wurde Ras(T35A)-GppNHp im Unterschuss eingesetzt, da dieses im konformationellen Zustand 1 vorliegt und bekannt ist (Spoerner *et al.* 2005A), dass Zn^{2+} -Cyclen hauptsächlich an diesen Zustand bindet.

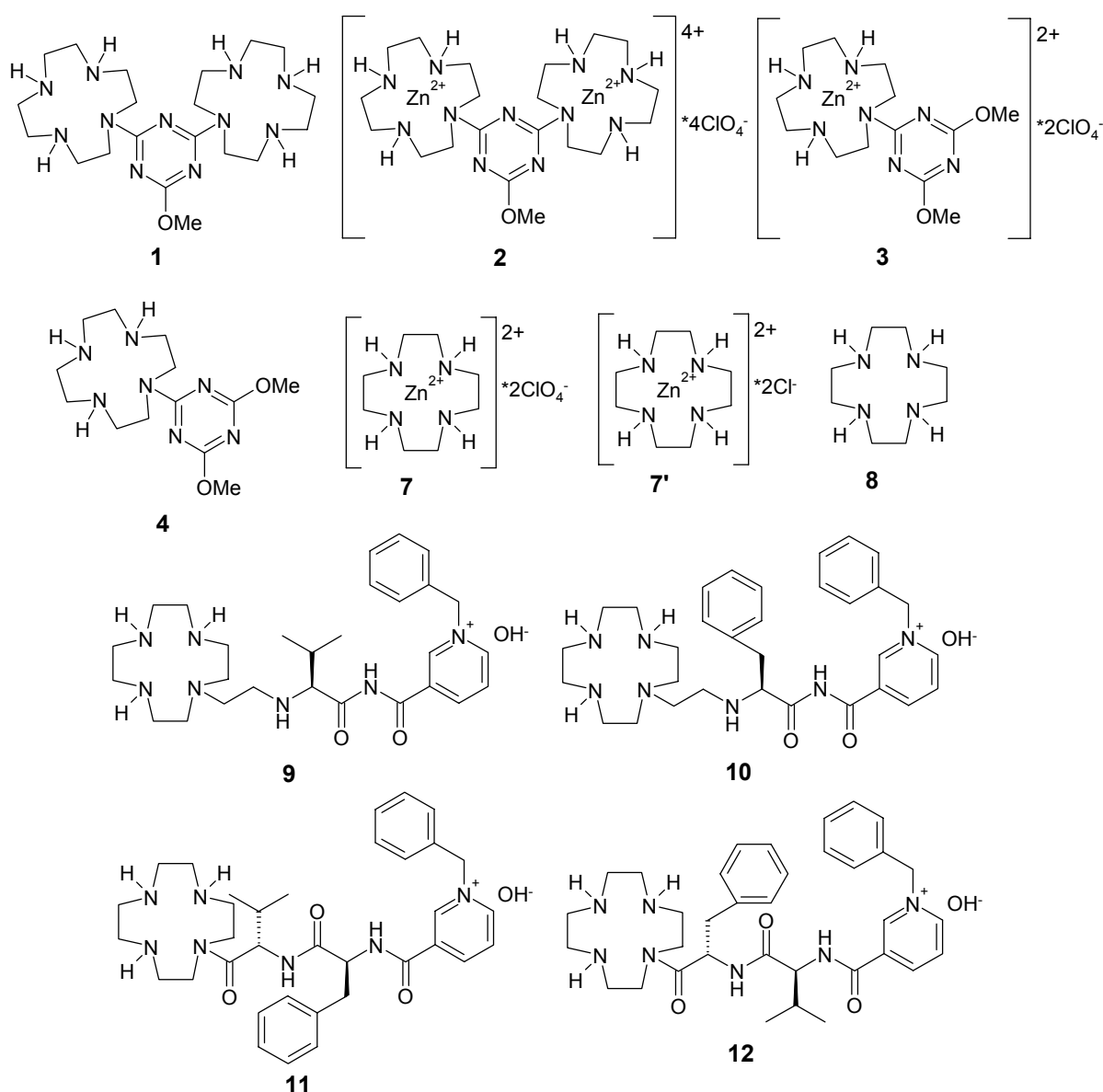


Abb. 4.6.1A: Erste Abbildung der Strukturen der am Lehrstuhl von Prof. Dr. B. König synthetisierten Verbindungen.

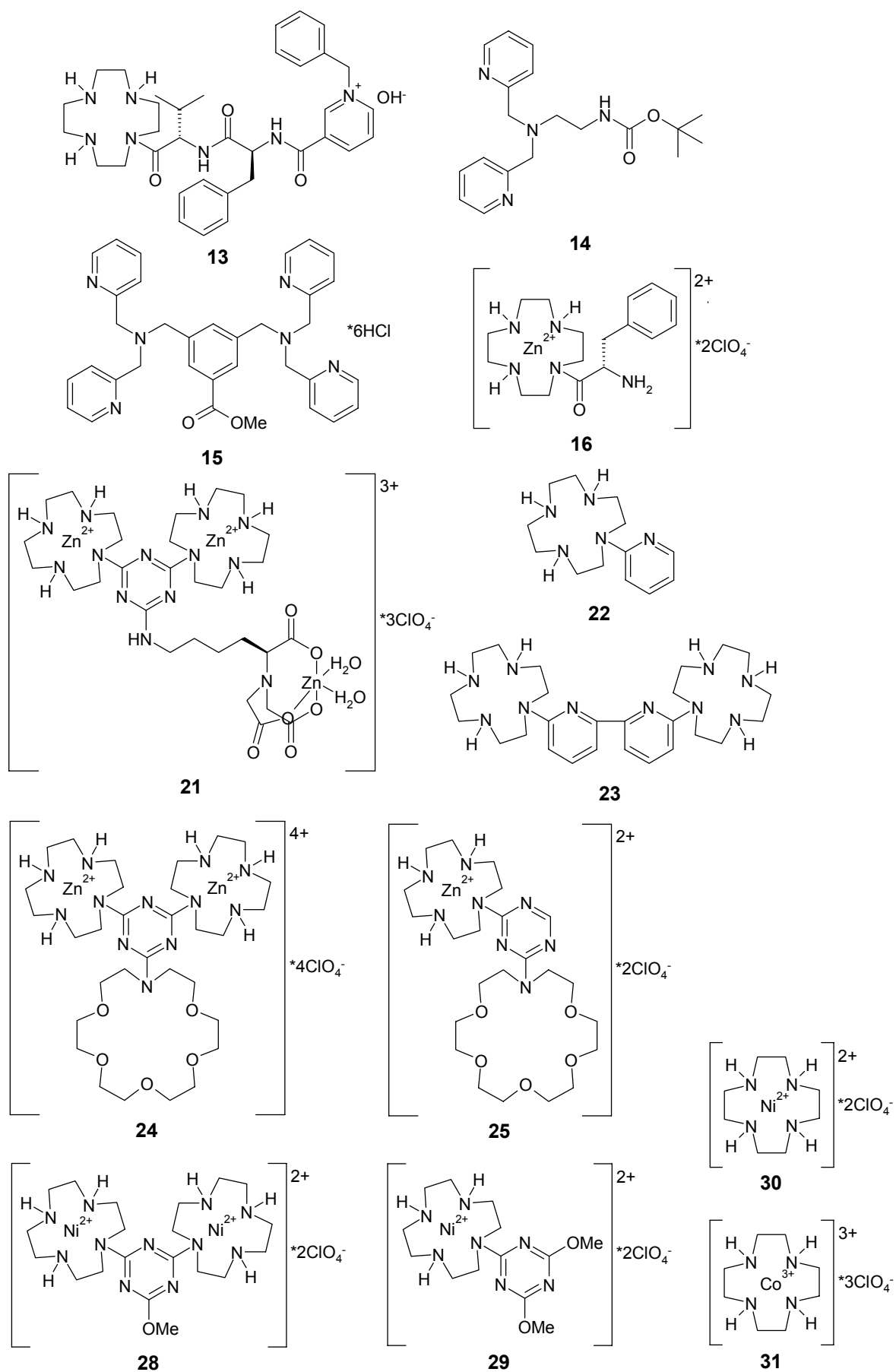


Abb. 4.6.1B: Zweite Abbildung der Strukturen der am Lehrstuhl von Prof. Dr. B. König synthetisierten Verbindungen.

Die Untersuchung der abgebildeten und der synthetisierten Verbindungen zeigten, dass neben dem schon als bindend bekannten Zn^{2+} -Cyclen zusätzlich vier Verbindungen gefunden wurden, die gut an das Ras-Protein zu binden scheinen (**Abb. 4.6.2**). Diese vier Substanzen wurden im Folgenden für Verdrängungs-experimente von Zn^{2+} -Cyclen aus dem Komplex mit Ras(T35A)-GppNHp eingesetzt.

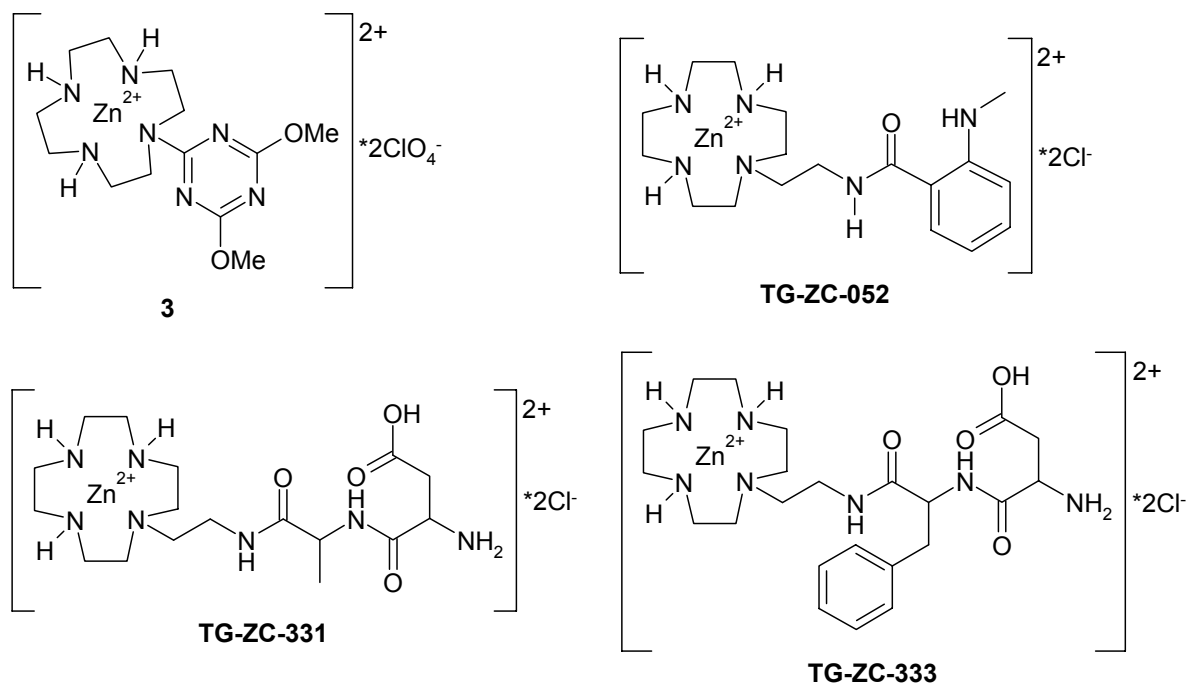


Abb. 4.6.2: Abbildung der Strukturen der neben Zn^{2+} -Cyclen am besten bindenden Zn^{2+} -Cyclen-derivate. Mit TG-ZC- gekennzeichnet sind die im Rahmen dieser Arbeit neu synthetisierten Verbindungen.

Die Untersuchungen an den Verbindungen zeigen auch, dass nur Substanzen, die Zn(II) als Zentralion besitzen, an den Ras-Nukleotid-Komplex binden. Wird das Cyclenderivat nicht mit einem Metallion komplexiert oder wird das Zn(II) -Ion durch Ni(II) bzw. Co(III) ersetzt, bindet es nicht mehr an das Protein. Alle Ergebnisse der *WaterLOGSY*-Untersuchungen sind in Tabelle 4.6.1 zusammengefasst.

| Verbindung | Gegenion | C _{Ras} (T35A) | C _{Verbindung} | bindet | Kommentar |
|------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|---------|-------------------|
| 1 | - | 20 μ M | 2 mM | nein | |
| 2 | ClO ₄ ⁻ | 20 μ M | 2 mM | schwach | |
| 3 | ClO ₄ ⁻ | 50 μ M | 5 mM | gut | |
| 4 | - | 20 μ M | 2 mM | nein | |
| 7 | ClO ₄ ⁻ | 50 μ M | 5 mM | gut | |
| 7' | Cl ⁻ | 50 μ M | 5 mM | gut | |
| 8 | - | 50 μ M | 5 mM | nein | |
| 9 | OH ⁻ | 50 μ M | 5 mM | nein | |
| 10 | OH ⁻ | 50 μ M | 5 mM | nein | |
| 11 | OH ⁻ | 20 μ M | 2 mM | nein | |
| 12 | OH ⁻ | 20 μ M | 2 mM | nein | |
| 13 | OH ⁻ | 20 μ M | 2 mM | nein | |
| 14 | - | 20 μ M | 2 mM | nein | |
| 15 | - | 20 μ M | 2 mM | nein | |
| 16 | ClO ₄ ⁻ | 50 μ M | 5 mM | ja | |
| 21 | ClO ₄ ⁻ | 50 μ M | 5 mM | ? | Protein fällt aus |
| 22 | - | 20 μ M | 2 mM | nein | |
| 23 | - | 20 μ M | 2 mM | nein | |
| 24 | ClO ₄ ⁻ | 20 μ M | 2 mM | ? | Protein fällt aus |
| 25 | ClO ₄ ⁻ | 50 μ M | 5 mM | ? | Protein fällt aus |
| 28 | ClO ₄ ⁻ | 20 μ M | 2 mM | nein | |
| 29 | ClO ₄ ⁻ | 20 μ M | 2 mM | nein | |
| 30 | ClO ₄ ⁻ | 50 μ M | 5 mM | nein | |
| 31 | ClO ₄ ⁻ | 50 μ M | 5 mM | nein | |
| TG-ZC-023 | Cl ⁻ | 20 μ M | 2 mM | schwach | |
| TG-ZC-025 | Cl ⁻ | 20 μ M | 2 mM | schwach | |
| TG-ZC-052 | Cl ⁻ | 20 μ M | 2 mM | gut | |
| TG-ZC-131 | Cl ⁻ | 40 μ M | 2 mM | schwach | |
| TG-ZC-132 | Cl ⁻ | 40 μ M | 2 mM | schwach | |
| TG-ZC-231 | Cl ⁻ | 40 μ M | 2 mM | nein | |
| TG-ZC-233 | Cl ⁻ | 40 μ M | 2 mM | nein | |
| TG-ZC-331 | Cl ⁻ | 20 μ M | 2 mM | gut | |
| TG-ZC-332 | Cl ⁻ | 20 μ M | 2 mM | schwach | |
| TG-ZC-333 | Cl ⁻ | 20 μ M | 2 mM | gut | |
| TG-ZC-334 | Cl ⁻ | 20 μ M | 2 mM | schwach | |
| TG-ZC-431 | Cl ⁻ | 20 μ M | 2 mM | schwach | |
| TG-ZC-432 | Cl ⁻ | 20 μ M | 2 mM | schwach | |

Tab. 4.6.1: Auflistung der Ergebnisse der Untersuchung des Bindungsverhaltens einzelner Verbindungen mit Hilfe von *WaterLOGSY*-NMR-Messungen in Messpuffer C bei 293K. Mit TG-ZC-gekennzeichnet sind die im Rahmen dieser Arbeit neu synthetisierten Verbindungen.

4.6.3 Verdrängungsstudien von Zn^{2+} -Cyclen durch Cyclenderivate an Ras(T35A)

Die Verbindungen, die eindeutig positive Signale im *WaterLOGSY*-Spektrum zeigten, wurden für Verdrängungsstudien mit Zn^{2+} -Cyclen verwendet. Dabei kann die Affinität der Verbindungen zum Protein aus dem Vergleich der Signalintensitäten des Zn^{2+} -Cyclens zu den Signalintensitäten der Verbindungen relativ zur Affinität des Zn^{2+} -Cyclen abgeschätzt werden. Die Verdrängungsexperimente wurden mit jeweils 2 mM der einzelnen Verbindung und 2 mM an Zn^{2+} -Cyclen in Gegenwart von 40 μM Ras(T35A)·GppNHp in Messpuffer C bei 293K durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass zwei dieser Verbindungen, TG-ZC-052 bzw. TG-ZC-333 (siehe Kapitel 4.5.2 bzw. 4.5.5), in der Lage sind, Zn^{2+} -Cyclen teilweise aus dem Komplex mit Ras zu verdrängen. Die Verdrängungsspektren sind im Vergleich zum *WaterLOGSY*-Spektrum des reinen Zn^{2+} -Cyclens in Abbildung 4.6.4 gezeigt.

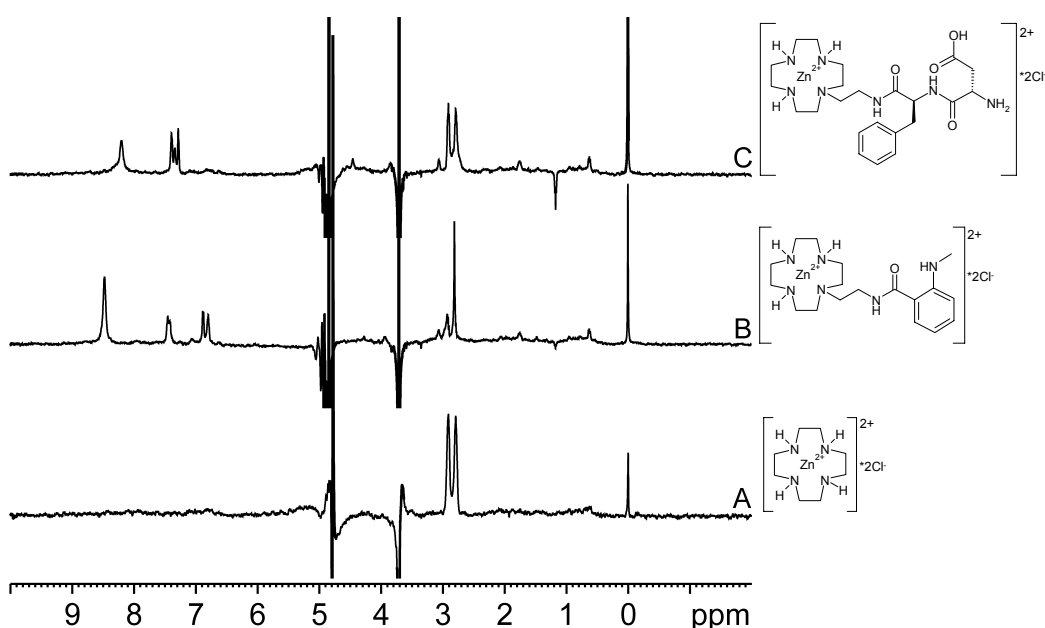


Abb. 4.6.4: Abbildung der ^1H -*WaterLOGSY*-Spektren in Messpuffer C mit 2 mM DSS und 5% D_2O . (A) 50 μM Ras(T35A)·GppNHp in Gegenwart von 5 mM Zn^{2+} -Cyclen, (B) 40 μM Ras(T35A)·GppNHp in Gegenwart von 2 mM Zn^{2+} -Cyclen und 2 mM TG-ZC-052 und (C) 40 μM Ras(T35A)·GppNHp in Gegenwart von 2 mM Zn^{2+} -Cyclen und 2 mM TG-ZC-333. Die Strukturen von Zn^{2+} -Cyclen, TG-ZC-052 und TG-ZC-333 sind neben den jeweiligen Spektren abgebildet. Alle Spektren wurden bei 293K aufgenommen, die resultierenden FIDs mit einer Exponentialfunktion gefiltert und mit einer Linienbreite 5 Hz prozessiert.

Aus den abgebildeten NMR-Spektren ist ersichtlich, dass die Signale des Zn^{2+} -Cyclens (**Abb. 4.6.4A**) bei 2.79 ppm und 2.90 ppm (entsprechen jeweils 8 Protonen von 4 CH_2 -Gruppen) deutlich gegenüber den Signalen an Intensität verlieren, die eindeutig der Verbindung TG-ZC-052 (**Abb. 4.6.4B**) zuzuweisen sind. Diese Signale liegen bei 2.81 ppm (entspricht 3 Protonen der N-Methylgruppe) und bei 6.80 ppm, 6.88 ppm, 7.42 ppm und 7.45 ppm (entspricht jeweils einem Proton des Phenylrings). Die Abnahme der Intensität weist auf einen geringeren Magnetisierungstransfer hin und lässt somit auf eine Verdrängung durch die Verbindung TG-ZC-052 schließen.

Gleiches gilt für die Signale zwischen 7.26 ppm und 7.43 ppm (entsprechen 5 Protonen des Phenylrings), die eindeutig der Verbindung TG-ZC-333 (**Abb. 4.6.4C**) zuzuweisen sind. Auch diese Signale sind im Vergleich viel intensiver als die des Zn^{2+} -Cyclens. Mit Hilfe der *WaterLOGSY*-Methode konnte daher gezeigt werden, dass die beiden im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Zn^{2+} -Cyclenderivate TG-ZC-052 und TG-ZC-333 in der Lage sind, das Zn^{2+} -Cyclen aus dem Komplex mit Ras(T35A)·GppNHp teilweise zu verdrängen und somit mindestens eine ebensogrosse Bindungsaffinität zum Ras-Nukleotid-Komplex besitzen, wie das Zn^{2+} -Cyclen selbst.

5 Diskussion

5.1 Expression von ^{15}N -markierten Ras-Proteinen

Für die rekombinante Herstellung von ^{15}N -markierten Proteinen ist es wichtig, ein geeignetes Expressionssystem zu finden, in dem sowohl die Bakterien sich gut vermehren, als auch die Überexpression des rekombinant hergestellten Proteins in guten Ausbeuten stattfindet. Für das Ras-Protein hat sich dabei der *E. coli* Stamm BL21(DE3) als sehr gut geeignet erwiesen, der in Minimal-Medien mit den geringen Mengen an Nährstoffen gut wächst. Mit Hilfe der Expressionstests konnten zudem die Bedingungen bestimmt werden, bei denen die Überexpression des Ras-Proteins in Lösung zu guten Ausbeuten führt. Dazu wurden die Zelldichte zum Zeitpunkt der IPTG-Zugabe, die IPTG-Konzentration, die Expressionstemperatur und die Expressionsdauer variiert. Bei den Tests zeigte sich, dass die Proteinausbeuten bei höheren Zelldichten zum Zeitpunkt der IPTG-Zugabe stark zurückgingen. Dieser Effekt kann durch den erhöhten Nährstoffverbrauch durch das Zellwachstum erklärt werden, wodurch für die anschließende Proteinexpression weniger Nährstoffe zur Verfügung standen und somit die Expression gehemmt wurde. Aufgrund der Abnahme der Proteinexpression bei erhöhter Zugabe von IPTG wurde die IPTG-Konzentration zur Induktion der Proteinexpression verringert. Eine höhere IPTG-Konzentration kann dabei sowohl einen Einfluss auf die Zelldichte (Zytotoxizität des IPTGs) ausüben, als auch die Anzahl von gebildeten „inclusion bodies“ erhöhen und somit die Konzentration des Proteins in Lösung verringern.

Bei den Expressionstests stellte sich zudem heraus, dass das Verhältnis zwischen Zellwachstum und Proteinüberexpression bei niedrigen Temperaturen (z.B. 32°C) in einem Minimalmedium gute Ergebnisse liefert. Da sowohl das Wachstum der Zellen, als auch die Expression des Proteins in Konkurrenz zueinander stehen und für die gleichzeitige Steigerung im Minimalmedium zu wenig Nährstoffe enthalten sind, bewirkt eine geringe Absenkung der Temperatur gegenüber der im Vollmedium verwendeten Expressionstemperatur ein geringeres Wachstum der Zellen und somit eine Steigerung der Proteinexpression.

Der Einfluss der Expressionszeit auf die Proteinausbeute war in den Tests kaum

bemerkbar, da sich die Nährstoffversorgung nach einer gewissen Zeit vermutlich deutlich verringerte und daher auch keine deutliche Expressionssteigerung durch die Verlängerung der Expressionszeit möglich war.

Zusätzlich zu den Veränderungen der Expressionsbedingungen wurde auch ein Test mit *New Minimal Medium* (NMM, Budisa *et al.* 1995) als Nährmedium durchgeführt, das zur Steigerung der Proteinausbeute führte. Grund hierfür könnte der im NMM-Medium enthaltene Phosphat-Puffer sein, der den pH-Wert des Mediums über den gesamten Expressionszeitraum hinweg sehr stabil hält. Mit all diesen Veränderungen war es möglich, die Proteinausbeute von ^{15}N -markiertem Ras(T35A) auf 17 mg/l Minimal-Medium zu steigern und somit einen guten Wert im Vergleich zu den maximal erreichten 45 mg/l Ras(T35A) im Vollmedium zu erhalten.

5.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

Für die Untersuchung der Bindung von Liganden an Rezeptoren wird häufig die Fluoreszenzspektroskopie herangezogen, da diese Untersuchungsmethode sehr empfindlich ist und mit geringen Probemengen auskommt. Ein Nachteil besteht jedoch in der geringen Information über die Art und die genaue Position der Bindung. Für Bindungsstudien am Ras-Protein wird dazu häufig das Nukleotid mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2-Methylamino-benzoesäure (Mant) markiert, der die Struktur des Proteins nicht oder nur sehr geringfügig ändert (John *et al.* 1990, Sydor *et al.* 1998). Untersuchungen dazu wurden von Scheidig *et al.* (1995) durchgeführt, in denen die Kristallstruktur von Ras(wt)·mGppNHp mit der von Ras(wt)·GppNHp verglichen wurde. Dabei wurden nur minimale Abweichungen im Bereich der N-Methylantranioyl-Gruppe (Mantgruppe) festgestellt.

In dieser Arbeit wurde die Bindung von Cyclenderivaten mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Dabei zeigte es sich, dass das Fluoreszenzsignal durch die Bindung der Cyclene an das Ras-Protein abnimmt.

Die Abnahme der Fluoreszenzemission kann jedoch auch durch andere Einflüsse, wie Temperaturänderungen, Dissoziation des Mant-Nukleotids oder das „Quenchen“ der Fluoreszenz durch den Liganden selbst hervorgerufen werden, die demzufolge auch die Ergebnisse beeinflussen. Der Einfluss des „Quenchens“

der Fluoreszenz durch den Liganden wurde für das Cu^{2+} -Cyclen näher untersucht. Bei hohen Konzentrationen nimmt die Fluoreszenzemission aufgrund der Lichtabsorption des Cu(II) -Ions im sichtbaren Bereich stark ab. Die Lösungen in denen Cu(II) -Ionen vorhanden sind, erscheinen daher meist blau. Dieser Effekt konnte jedoch durch die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten bei 400 nm umgangen werden. In Absorptionsmessungen konnte gezeigt werden, dass das Cu^{2+} -Cyclen lediglich sehr schwach bei dieser Wellenlänge absorbiert.

Aus den Ergebnissen der NMR-Untersuchungen gehen drei mögliche Bindungsstellen für Cyclene am Ras-Protein hervor. Dabei befinden sich die am γ -Phosphat des Nukleotids gelegene 1. Bindungsstelle und die in der Nähe des His27 gelegene 2. Bindungsstelle im Bereich der Mantgruppe des Nukleotids. Die andere Bindungsstelle in der Nähe des Asp108 ist hingegen räumlich weiter vom Fluoreszenzfarbstoff im Ras-Protein entfernt. Aus der Kristallstruktur von Scheidig *et al.* (1995) ergibt sich ein Abstand des Asp108 von mehr als 35 Å zur Mantgruppe und von mehr als 27 Å zum γ -Phosphat des Nukleotids. Beide Abstände sind jeweils durch die gesamte Proteinstruktur hindurch gemessen, da sich das Asp108 auf der gegenüberliegenden Seite des Proteins befindet. Aufgrund dieser Anordnung der Bindungsstellen sind wahrscheinlich die ersten beiden Bindungsstellen hauptsächlich für die Abnahme der Fluoreszenzemission bei der Bindung der Cyclene verantwortlich. Keinen Einfluss dagegen sollte die Bindung der Cyclene im Bereich des Asp108 auf die Fluoreszenzänderungen nehmen.

Wegen der aufgeführten komplexen Einflüsse der Bindungsstellen auf die Fluoreszenzänderungen ist eine exakte Auswertung schwierig, da die einzelnen Effekte nicht genau bestimmt werden können. Aus diesem Grund wurde die Auswertung der Fluoreszenzdaten einfach gehalten und eine 1:1 Bindung im schnellen Austausch angenommen. Mit dieser Auswertungsmethode können dennoch die einzelnen Dissoziationskonstanten von Zn^{2+} - und Cu^{2+} -Cyclen an die untersuchten Ras-Proteine gut miteinander verglichen werden.

Dazu wurde für die Auswertung der Bindung von Zn^{2+} -Cyclen an das Ras-Protein die Emissionsflächenänderung und für die Bindung von Cu^{2+} -Cyclen an das Ras-Protein die Emissionsintensitätsänderung bei 400 nm herangezogen. Im Vergleich aller Ergebnisse lässt sich erkennen, dass der Zn(II) -Komplex um ein vielfaches besser an das Ras-Protein bindet als das Cu^{2+} -Cyclen. Diese generell höhere

Affinität des Zn^{2+} -Cyclens zum Ras-Protein kann auf die größere Lewis Acidität des Zn^{2+} -Ions im Vergleich zum Cu(II) -Ion im Komplex mit Cyclen zurückgeführt werden. Auch die Komplexgeometrie der beiden Cyclenderivate ist unterschiedlich, da das Zn(II) -Ion die Spitze einer tetragonalen Pyramide einnimmt und das Cu(II) -Ion eine quadratisch-planare Struktur mit Cyclen ausbildet. Zudem besitzt das Zn(II) -Ion im Komplex mit dem Cyclen zusätzlich eine 5. Koordinationsstelle, die in wässrigen Lösungen durch ein H_2O -Molekül besetzt ist. Dadurch können größere elektrostatische Interaktionen zwischen dem positiv geladenen Zink(II)-Ion und negativ geladenen Bindungspartnern im Protein oder am Nukleotid ausgebildet werden, die möglicherweise Einfluss auf die Bindungslänge und die Bindungskonstante ausüben.

Aus den Untersuchungen an $\text{Ras(T35A)}\cdot\text{mGppNHp}$, das sich fast ausschließlich im konformationellen Zustand 1 befindet, konnten Fluoreszenzänderungen errechnet werden, deren Auswertungen zu Dissoziationskonstanten von 0.17 mM bzw. 4.2 mM für das Zn^{2+} - bzw. Cu^{2+} -Cyclen bei 25°C führten. Für die Bindung des Cu^{2+} -Cyclens wurde zudem die Auswertung der Emissionsflächenabnahme mit den Fluoreszenzintensitätsabnahmen bei 437 nm (Maximum der Fluoreszenzintensität), 425 nm und bei 400 nm miteinander verglichen.

Dabei unterscheiden sich die erhaltenen Dissoziationskonstanten aus der Emissionsflächenänderung (2.6 mM) und aus Intensitätsänderungen bei 437 nm (2.8 mM) und 425 nm (2.9 mM) kaum voneinander. Im Gegensatz dazu weicht der K_D -Wert, der mit Hilfe der Intensitätsänderung bei 400 nm zu 4.2 mM errechnet wurde, von den oben genannten doch deutlich ab. Daraus lässt sich erkennen, dass die Eigenabsorption des Cu(II) -Ions zwar einen geringen, jedoch signifikanten Einfluss auf die Auswertung der Untersuchungen mit Cu^{2+} -Cyclen besitzt.

Außerdem wurde der Einfluss der Temperatur auf die Bindungsaffinität des Cu^{2+} -Cyclens untersucht. Dazu wurde eine Messreihe bei 5°C aufgenommen und die Fluoreszenzintensitätsabnahme bei 400 nm ausgewertet. Das Ergebnis ($K_D = 2.8 \text{ mM}$ bei 5°C) bestätigt die Abhängigkeit der Dissoziationskonstante von der Temperatur und somit eine um etwa das 1.5-fache höhere Affinität des Cu^{2+} -Cyclens zum Ras-Protein bei niedrigeren Temperaturen.

Die annähernd ähnlichen Ergebnisse der Bindungsuntersuchungen am $\text{Ras(wt)}\cdot\text{mGDP}$ zu denen am $\text{Ras(T35A)}\cdot\text{mGppNHp}$ zeigen, dass die strukturellen

Änderungen am Ras-Protein im Bereich der Bindungsstelle 1 keinen großen Einfluss auf die Bindungsaffinität der Cyclene nehmen. In den ^{31}P -NMR-Untersuchungen an Ras(T35A)-GDP (Kapitel 4.3.2) konnte gezeigt werden, dass zumindest das Cu^{2+} -Cyclen nicht an die Bindungsstelle 1 bindet, wenn GDP statt GppNHp im Komplex mit dem Ras-Protein gebunden ist. Das könnte bedeuten, dass die Fluoreszenzänderungen eher von der Bindung der Cyclene an der Bindungsstelle 2 hervorgerufen werden. In den NMR-Untersuchungen (Kapitel 4.3.4.3) konnte auch gezeigt werden, dass die Cyclene zudem besser an diese Bindungsstelle binden.

Der Unterschied in den Dissoziationskonstanten ist bei den Untersuchungen der Abnahme des Fluoreszenzsignals von Ras(wt)·mGppNHp (1.86 mM für Cu^{2+} -Cyclen und 0.61 mM für Zn^{2+} -Cyclen) im Vergleich zu den Untersuchungen an Ras(T35A)·mGppNHp geringer. Diese Feststellung kann mit Hilfe der Angleichung der Daten mit Hilfe des 1:1 Bindungsmodells, das dem realen Bindungsmodell nur angenähert ist, erklärt werden. Die Verwendung eines komplexeren Bindungsmodells ist jedoch nicht möglich, da es nicht in eine einfache Formel zur Auswertung umgesetzt werden kann. Es ist jedoch deutlich zu erkennen (**Abb. 4.2.6**), dass ein komplexeres Bindungsmodell die Fluoreszenzänderungen besser beschreiben würde.

Ein Grund für diese Abweichungen kann das Vorliegen des Ras(wt)·mGppNHp in zwei Zuständen (Spoerner *et al.* 2004) sein, die unterschiedlich emittieren. Die Cyclenderivate binden jedoch nur an den Zustand 1 (Spoerner *et al.* 2005A) und verschieben dadurch das Gleichgewicht im Protein. Durch diese Verschiebung könnte dann zusätzlich das Fluoreszenzsignal abnehmen, obwohl die Fluoreszenzabnahme nicht durch die Bindung der Cyclene an die Bindungsstelle 2 hervorgerufen wird.

Insgesamt zeigen die Fluoreszenzuntersuchungen jedoch, dass das Zn^{2+} -Cyclen durchschnittlich etwa 10 mal besser an das Ras-Protein im Zustand 1 bindet, als das Cu^{2+} -Cyclen.

5.3 NMR-Spektroskopische Untersuchungen

Die ^{31}P -NMR-Spektroskopie ist schon mehrfach dazu verwendet worden, um zwischen den zwei konformationellen Zuständen 1 und 2 des Ras-Proteins im Komplex mit GppNHp zu unterscheiden (Geyer *et al.* 1996, Spoerner *et al.* 2005B). Dabei konnten Spoerner *et al.* (2005A) zeigen, dass Zn^{2+} -Cyclen nur an das Ras-Protein im Zustand 1 bindet und auch das konformationelle Gleichgewicht zwischen beiden Zuständen zum Zustand 1 hin verschieben kann. Jedoch konnte bisher die Struktur dieses Zustands noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Ebenso war aus den ^{31}P -NMR-Spektren zwar die Bindungsstelle des Zn^{2+} -Cyclens im Bereich des γ -Phosphats des gebundenen Nukleotids ungefähr abzuschätzen, jedoch war die genaue Position und ebenfalls die Anzahl der bindenden Cyclene noch nicht bekannt. Diese Fragestellungen sollten im Rahmen dieser Arbeit weiter geklärt werden.

Zunächst wurde die Bindungsstelle im Bereich des γ -Phosphats mit Hilfe der ^{31}P -NMR-Spektroskopie näher untersucht. Dazu wurde das paramagnetische Cu^{2+} -Cyclen verwendet. Dieses Cyclenderivat bewirkt mit dem einzelnen ungepaarten Elektron des Cu(II) -Ions, dass die Resonanzsignale von nahen, NMR-aktiven Kernen durch Spinrelaxation verbreitert werden. Dadurch nimmt auch die Intensität der Signale ab und kann zusätzlich zur Auswertungen herangezogen werden.

Es wurde die Bindung von Cu^{2+} -Cyclen an Ras(wt) und an eine Reihe von Ras-Mutanten im Komplex mit GppNHp mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie untersucht (siehe Kapitel 4.3.1). Dabei zeigten alle Resonanzsignale, die dem Zustand 1 zuzuordnen sind, Veränderungen in den chemischen Verschiebungen und in den Linienbreiten. Die Signale der jeweiligen γ -Phosphate wurden dabei sehr stark verändert. Keine erkennbaren Änderungen zeigten jedoch die Signale, die jeweils dem Zustand 2 zugeordnet werden können, wenn die Ras-Mutanten überhaupt in diesem vorliegen. Daraus kann gefolgert werden, dass auch das Cu^{2+} -Cyclen, wie das Zn^{2+} -Cyclen, nur an den Zustand 1 des Ras-Proteins bindet. Die unterschiedlichen Verschiebungen des γ -Phosphatsignals bei der Titration von Cu^{2+} -Cyclen (Hochfeld-verschoben) und Zn^{2+} -Cyclen (Tieffeld-verschoben) (Spoerner *et al.* 2005A) können durch die größere Lewis Acidität des Zn(II) -Ions

gegenüber dem Cu(II)-Ion im Komplex mit Cyclen und mit Hilfe der unterschiedlichen Komplexgeometrie erklärt werden (siehe Kapitel 5.2). Durch diese Eigenschaften können sich größere elektrostatische Interaktionen zwischen dem positiv geladenen Zink(II)-Ion und dem negativ geladenem Sauerstoff der γ -Phosphatgruppe ausbilden, die Einfluss auf die Bindungslänge, die Bindungskonstante und möglicher Weise auch auf die Richtung der Änderung in der chemischen Verschiebung ausübt.

Die weitere Untersuchung an Ras(T35A)-GTP (siehe Kapitel 4.3.2) zeigt, dass das Cu²⁺-Cyclen nicht nur an das Ras-Protein bindet, wenn GppNHp gebunden ist, sondern auch dann, wenn das Protein in der natürlichen GTP-gebundenen Form vorliegt. Dadurch wird gezeigt, dass die NH-Gruppe des Nukleotids zumindest keinen großen Einfluss auf Bindung des Cyclens besitzt. Außerdem kann durch Untersuchungen an Ras(wt)-GDP gezeigt werden, dass das γ -Phosphat des Nukleotids wichtig für die Bindung des Cyclens in diesem Bereich ist.

Nach dieser Erkenntnis wurde versucht, den Abstand des paramagnetischen Cu(II)-Ions zu den einzelnen Nukleotid-Phosphaten mit Hilfe von Relaxationszeitmessungen an den Phosphorkernen zu bestimmen (siehe Kapitel 4.3.3). Dieser Abstand kann mit Hilfe von kleinen Vereinfachungen in der Solomon-Bloembergen-Gleichung aus den Relaxationsraten von NMR-aktiven Kernen zu einem paramagnetischen Zentrum bestimmt werden (R.A. Dwek 1973, Arnesano *et al.* 2003). Für diese Untersuchungen wurde das Ras(T35A)-GppNHp gewählt, da es nahezu vollständig in der Konformation des Zustands 1 vorliegt.

Da in die Gleichung zur Berechnung der Relaxationszeiten des Cyclen-Ras-Komplexes (Gleichung 3.6) die Dissoziationskonstante eingeht, musste diese für den Cu²⁺-Cyclen-Ras(T35A)-Komplex bestimmt werden. Dazu wurden die Änderungen der chemischen Verschiebungen aller drei Phosphate gleichzeitig mit der Gleichung 3.15 für ein 1:1 Bindungsmodell angepasst (siehe Kapitel 4.3.3.1). Da dieses Bindungsmodell auch der Berechnung der Relaxationsraten zugrunde liegt, wurde es zur Auswertung herangezogen, obwohl es nicht dem Bindungsmodell der Cyclen-Ras-Bindung entspricht, wie aus den 2D-NMR-Untersuchungen hervorgeht. Der damit ermittelte K_D-Wert für die Cu²⁺-Cyclen-Ras-Bindung ist mit 72 mM recht groß. Im Vergleich zu dem K_D-Wert aus einer ähnlichen Titration von Zn²⁺-Cyclen mit Ras(T35A)-GppNHp von ca. 7 mM, (M. Spörner, Universität Regensburg) und zu den Ergebnissen der Fluoreszenz-

untersuchungen (Zn^{2+} -Cyclen bindet etwa 10 mal besser als Cu^{2+} -Cyclen) ist dieser erhaltene K_D -Wert für das Cu^{2+} -Cyclen jedoch im erwarteten Bereich. Die etwa 10-fach höhere Bindungskonstante von Zn^{2+} -Cyclen an das Ras-Protein kann auch mit Hilfe der Cyclen-Komplexstruktur erklärt werden. Das Zn(II) -Ion besitzt in der Cyclen-Komplexstruktur eine freie 5. Koordinationsstelle, die der Cu(II) -Komplex nicht aufweist. Dadurch kann das Zn^{2+} -Cyclen zusätzlich zu möglichen Interaktionen mit dem Protein auch noch stärkere ionische Wechselwirkungen als das Cu^{2+} -Cyclen mit negativ geladenen Atomen wie dem γ -Phosphat eingehen.

Für die Auswertung der Relaxationszeitmessungen wurden den aufgenommenen ^{31}P -NMR-Spektren mit Lorentzlinien angepasst (siehe Kapitel 3.4). Die dazu benötigten Kopplungskonstanten wurden vom freien GppNHp-Nukleotid übernommen (Spoerner *et al.* 2005B), da eine Bestimmung der Kopplungskonstanten des gebundenen Nukleotids aufgrund der durch die Komplexbildung mit dem Ras-Protein verbreiterten Signale sehr schwierig und mit großen Fehlern behaftet ist.

Aus den *inversion recovery* ^{31}P -NMR-Experimenten (Kapitel 4.3.3.2) konnten die longitudinalen Relaxationsraten der Phosphorkerne des Cu^{2+} -Cyclen-Ras(T35A)·GppNHp-Komplexes berechnet werden, die 19.6 s^{-1} für das α -Phosphat, 38.5 s^{-1} für das β -Phosphat und 625 s^{-1} für das γ -Phosphat betragen. Diese Werte zeigen bereits, dass das Cu(II) -Ion des Cyclens deutlich näher am γ -Phosphat als am β - und α -Phosphat des Nukleotids liegen muss. Dieser Eindruck spiegelt sich auch in den mit Hilfe der abgewandelten Solomon-Bloembergen-Gleichung (Gleichung 3.8) erhaltenen Abstände wieder. Die Fehler der Abstände ($\text{Cu(II)}\text{-P}_\alpha = 5.4 \text{ \AA}$, $\text{Cu(II)}\text{-P}_\beta = 4.8 \text{ \AA}$, $\text{Cu(II)}\text{-P}_\gamma = 3.0 \text{ \AA}$) wurden mit Hilfe der Fehler der Relaxationszeiten abgeschätzt. Dabei lag der Fehler beim α - und β -Phosphat deutlich höher als beim γ -Phosphat. Außerdem weist eine veröffentlichte Kristallstruktur eines Zn^{2+} -Cyclenderivats, das sich in einem 1:1 Komplex mit Phenylphosphat befindet (Aoki *et al.* 2002), einen Abstand vom Zink(II)-Ion zum Phosphoratom von 2.94 \AA auf. Dieser Abstand zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem berechneten $\text{Cu(II)}\text{-}^{31}\text{P}$ -Abstand von 3.0 \AA für das γ -Phosphat.

Mit diesen Untersuchungen konnte die erwähnte Bindungsstelle 1 gut charakterisiert werden. Es war jedoch aus den Fluoreszenzuntersuchungen an

Ras(wt)·GDP schon ersichtlich, dass noch mindestens eine weitere Bindungsstelle für das Cyclen am Ras-Protein existieren muss.

Um zu untersuchen, wie viele weitere Bindungsstellen sich am Ras-Protein für Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Cyclen befinden, wurden 2D-NMR-Messungen an ^{15}N -markiertem Ras(T35A)·GppNHp durchgeführt, da die chemischen Verschiebungen der Amidprotonen des Proteinerückgrats sehr sensitiv gegenüber strukturellen Änderungen sind. Wegen der fehlenden Struktur und der unbekannten Zuordnung der ^1H - ^{15}N -Signale von Ras(T35A) wurde die Zuordnung der Mutante Ras(T35S) auf das Ras(T35A) übertragen. Dies ist möglich, da sich Ras(T35S), wie Ras(T35A) auch im Zustand 1 befindet, wenn GppNHp gebunden ist und da sich F. Schumann (Universität Regensburg) parallel zu dieser Arbeit mit der Struktur von T35S beschäftigte (Manuskript in Vorbereitung). Die Zuordnung der ^1H - ^{15}N -Signale von Ras(T35S) liegt jedoch bei einem pH-Wert von 5.5 vor, wodurch die Übertragung nur bei diesem pH-Wert durchgeführt werden konnte. Bei der pH-Titration von Ras(T35A) ist deutlich zu erkennen (**Abb. 4.3.6**), dass die Aminosäuren im Bereich der mutierten Stelle (Thr35), besonders jedoch in der Schalter I Region, starke Änderungen in den chemischen Verschiebungen aufweisen. Ein Grund dafür könnte die teilweise Protonierung einer Phosphatgruppe des Nukleotids ab einem pH-Wert von 5.5 sein, die zu starken Verschiebungen in der Ras-Struktur in diesem Bereich führen kann. Mit Hilfe dieser übertragenen Zuordnung konnten ^1H - ^{15}N -NMR-Untersuchungen an Ras(T35A)·GppNHp mit Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Cyclen durchgeführt werden.

Wie Arnesano *et al.* (2003) schreiben, kann das paramagnetische Cu(II)-Ion dazu verwendet werden, um auf direktem Weg Aminosäuren bestimmen zu können, die an der Bindung beteiligt sind. Wie bereits erwähnt ist dies möglich, da das Cu(II)-Ion die Linien von NMR-aktiven Kernen verbreitert. Arnesano *et al.* (2003) zeigten in ihrer Veröffentlichung, dass die abstandsabhängige, starke Linienverbreiterung für Protonen in einem Bereich von 11 Å, für Stickstoffkerne in einem Bereich von 6 Å um das Cu(II)-Ion herum zu einem Verschwinden der Signale im NMR-Spektrum führt. Daher wurden ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren bei der Titration von ^{15}N -Ras(T35A)·GppNHp mit Cu^{2+} -Cyclen aufgenommen, um Änderungen in den Intensitäten der Amidsignale untersuchen zu können. Aus den starken Intensitätsänderungen der Signale (**Abb. 4.3.7**) konnte anschließend die Anzahl der Bindungsstellen und die Aminosäuren im Bereich dieser Bindungsstellen

bestimmt werden.

Bei dieser Untersuchung bestätigte sich die aus der ^{31}P -NMR-Spektroskopie bereits bekannte Bindungsstelle 1, da sehr starke Intensitätsänderungen im Bereich der Aminosäuren Gly13, Ile36, Ala59 und Gly60 auftraten. Eine zweite Bindungsstelle konnte im Bereich der Aminosäuren Asn26 - Val29 und eine Dritte im Bereich der Aminosäuren Asp105 - Met111 identifiziert werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass hauptsächlich drei Cu^{2+} -Cyclene an ein Ras-Protein binden. Durch die Markierung der drei Bindungsstellen in der veröffentlichten Kristallstruktur von Ras(wt)·GppNHp (Pai *et al.* 1990) (**Abb. 4.3.9**) kann verdeutlicht werden, dass die Bindungen des Cyclens an die drei Bindungsstellen wahrscheinlich unabhängig voneinander sind, da sich diese in räumlich getrennten Regionen des Proteins befinden.

Diese drei Bindungsstellen wurden mit Hilfe einer Titration von ^{15}N -markiertem Ras(T35A)·GppNHp mit Zn^{2+} -Cyclen weiter charakterisiert. Dabei konnten die Änderungen in den chemischen Verschiebungen aus ^1H - ^{15}N -TROSY-NMR-Spektren ausgewertet werden, was bei der Titration mit Cu^{2+} -Cyclen aufgrund der starken Linienverbreiterung nicht möglich ist. In den Darstellungen von **Abb. 4.3.11** ist gut zu erkennen, dass sich diese Änderungen hauptsächlich auf die drei postulierten Bindungsstellen beschränken. Zur Auswahl der Markierung wurden die Ergebnisse der 2D-NMR-Titrationsen von Cu^{2+} - bzw. Zn^{2+} -Cyclen verwendet. Dazu wurden die Aminosäuren farbig markiert, die Änderungen größer dem Mittelwert + einer Standardabweichung bzw. dem Mittelwert + zwei Standardabweichungen aufwiesen.

Mittels dieser TROSY-NMR-Experimente mit Zn^{2+} -Cyclen konnten auch die Dissoziationskonstanten der drei Cyclen-Ras-Bindungen berechnet werden. Dazu wurde eine etwas komplexere Methode als in den Fluoreszenztitrationsen verwendet. Dieses Modell basiert ebenfalls auf dem Bindungsmodell einer 1:1 Bindung im schnellen Austausch. Allerdings wurde diese Auswertungsmethode dementsprechend modifiziert (siehe Kapitel 4.3.4.3), dass der Fehler minimiert wird, der durch das vereinfachte Bindungsmodell entsteht. Daher wurden mit Hilfe dieses Modells lediglich die freien Konzentrationen des Liganden für jeden einzelnen Titrationsschritt bestimmt. Die Dissoziationskonstanten können anschließend mit Hilfe der Gleichung **3.17** berechnet werden. Für diese Auswertungsmethode mussten jedoch zunächst repräsentative Aminosäuren für

die jeweiligen Bindungsstellen ausgewählt werden. Dazu wurden die Aminosäuren Ile36, His27 und Asp108 bestimmt, da diese drei die größten Änderungen in den 2D-NMR-Titrationsen mit den Cyclenen aufwiesen (siehe **Tab. 4.3.3**). Über die Auswahl der Aminosäuren und das Vorgehen bei der Auswertung der NMR-Daten wurde bereits in Kapitel 4.3.4.3 ausführlich diskutiert.

Als Ergebnis dieser Auswertungsmethode konnten die Dissoziationskonstanten für die drei Bindungsstellen des Zn^{2+} -Cyclens am Ras-Protein bestimmt werden. Diese betragen 6.7 mM für die erste Bindungsstelle am γ -Phosphat des Nukleotids, 4.2 mM für die zweite Bindungsstelle in der Nähe von His27 und 0.64 mM für die dritte Bindungsstelle im Bereich des Asp108. Diese K_D -Werte können durch die Auswertungen mit dem einfachen Bindungsmodell der 1:1-Bindung im schnellen Austausch bestätigt werden. Dabei konnte mit Hilfe der ^{31}P -NMR-Spektroskopie ein K_D -Wert für die Bindungsstelle 1 von etwa 7 mM bestimmt werden (M. Spörner), der mit dem neu berechneten Wert gut übereinstimmt. Auch die erhaltene 10-fach schlechtere Bindung von Cu^{2+} -Cyclen an das Ras-Protein aus den Fluoreszenzuntersuchungen, für die eine Dissoziationskonstante von 72 mM aus den ^{31}P -NMR-Daten berechnet werden konnte (siehe Kapitel 4.3.3.1), bestätigt diesen Wert. Eine weitere Bestätigung für die berechneten K_D -Werte findet sich im ersten Schritt der Auswertungsmethode, der Berechnung der maximalen Verschiebungsänderung der Amidstickstoffsignale. Dabei konnte neben den maximalen Verschiebungsänderungen auch eine vorläufige Dissoziationskonstante für die Bindungsstelle 3 nach dem 1:1-Bindungsmodell berechnet werden. Dieser dabei berechnete K_D -Wert von 0.81 mM stimmt, unter Berücksichtigung der Fehler, ebenfalls gut mit dem endgültigen Wert von 0.64 mM überein.

Damit kann nachgewiesen werden, dass die Verwendung eines 1:1-Bindungsmodells für die Auswertung der Dissoziationskonstanten zwar unvollständig ist, die damit verursachten Fehler sich jedoch nicht groß auf die K_D -Werte auswirken. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Zn^{2+} -Cyclen am stärksten an die Bindungsstelle 3 in der Nähe des Asp108 bindet. Die Bindungsstelle 1 am γ -Phosphat des Nukleotids ist jedoch die sensitivste, da mittels dieser Bindung zwischen den beiden Zuständen des Ras-GppNHp-Komplexes unterschieden werden kann.

5.4 Moleküldynamikrechnungen

Zur Berechnung von Molekülstrukturen gibt es zahlreiche Programme, wie SYBIL (www.Tripos.com), CYANA (Güntert *et al.* 1997) oder CNS (Brunger *et al.* 1998), die unterschiedliche Ansätze verfolgen. Dazu können die unterschiedlichsten Informationen wie Homologiemodelle oder Abstandsdaten in die Programme eingelesen werden. Allerdings ist es äußerst aufwendig, Berechnungen für Molekülkomplexe durchzuführen, wie sie für die Komplexbildung zweier Proteine notwendig sind. Dominguez *et al.* (2003) ist es mit dem CNS-Skript HADDOCK (*High Ambiguity Driven protein-protein Docking*) gelungen, auf einfache Art Informationen über die Bindungsstelle(n) in diese Berechnungen einfließen zu lassen.

Dazu können uneindeutige Interaktionsabstände (*AIRs* = *Ambiguous Interaction Restraints*) und Bindungsbereiche mit hoher und geringer Flexibilität definiert werden, wie sie aus experimentellen Daten (z.B. Änderungen in den chemischen Verschiebungen in einem NMR-Titrationsexperiment) hervorgehen. Die Anwendung dieses Programms zur Modellierung der Struktur eines Protein-Ligand-Komplexes wurde bereits von Schieborr *et al.* (2005) beschrieben. Dabei konnten gute Ergebnisse von modellierten Protein-Ligand-Komplexen im Vergleich zu den bereits bestehenden Kristallstrukturen mit Hilfe von lediglich geringen Informationen erzielt werden.

Die meisten Informationen für die Bindung von Cyclenen konnten in dieser Arbeit für das Cu^{2+} -Cyclen erhalten werden, das an die postulierte Bindungsstelle 1 des Ras-Proteins in der Konformation des Zustands 1 bindet. Daher wurde zur Berechnung einer Komplexstruktur von Cu^{2+} -Cyclen das Ras(T35A)·GppNHp ausgewählt. Dazu musste die Kristallstruktur von Ras(wt)·GppNHp (Pai *et al.* 1990) verwendet und an der Position 35 verändert werden, da für das Ras(T35A)·GppNHp noch keine Struktur bekannt ist. Für das Cu^{2+} -Cyclen wurde die Kristallstruktur von M. Kruppa (2005) verwendet.

In die Berechnungen flossen alle Ergebnisse der durchgeführten NMR-Untersuchungen an Ras(T35A) ein. Dabei wurden die Abstandsinformationen aus den Cu^{2+} -Cyclen-Daten in eine zusätzliche *unambiguous*-Tabelle eingeführt. Darin enthalten sind die $\text{Cu(II)}\text{-}^{31}\text{P}$ -Abstände aus der Abstandsbestimmung mittels der Relaxationszeiten, die Abstände des Mg(II) -Ions zu ausgewählten Atomen des

Ras-Nukleotid-Komplexes aus der veröffentlichten Röntgenstruktur von Ras(T35S)·GppNHp (Spoerner *et al.* 2001), die Cu^{2+} -Abstände zu den Cyclenatomen und die Abstandsbegrenzungen für die einzelnen $\text{Cu(II)}\text{-}^{15}\text{N}$ -Abstände, wie bei Arnesano *et al.* (2003) beschrieben.

Dabei war die Festsetzung des Mg(II) -Ions für die Stabilisierung des Ras-Nukleotid-Komplexes während der Rechnung von großer Bedeutung und wurde aus der strukturell und konformationell sehr ähnlichen Röntgenstruktur der T35S Mutante mit geringen Abstandsbegrenzungen übernommen. Die Abstände des Cu(II) -Ions zu den einzelnen Cyclenatomen wurden mit sehr kleinen Abstandsbegrenzungen eingeführt, um das Cu^{2+} -Cyclen während der gesamten Rechnung zu fixieren. Ohne diese Fixierung, die auch in anderen Startdateien, wie den Torsiontop-Dateien durchgeführt wurde, bestand die Gefahr, dass der sehr stabile Cu^{2+} -Cyclen-Komplex mangels zu geringer Abstandsvorgaben zerfällt. Zuletzt wurden die von Arnesano *et al.* (2003) vorgeschlagenen $\text{Cu(II)}\text{-}^{15}\text{N}$ -Abstände der Aminosäuren, die bei der Titration mit Cu^{2+} -Cyclen starke Verbreiterungen aufzeigten, mit Distanzen von 6 Å versehen. Dabei wurde eine untere Abstands-begrenzung von -4 Å eingeführt, die einen Mindestabstand von 2 Å (Kontaktabstand) bewirken soll. Bei den etwas schwächer verbreiterten Aminosäuren wurde zusätzlich eine obere Abstandsbegrenzung von +2 Å verwendet, um die Festlegung des Abstands etwas aufzuweiten.

In die „AIR“-Tabelle wurden die Aminosäuren eingetragen, die starke Änderungen in der chemischen Verschiebung in den $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren aufzeigten und sich nahe der Bindungsstelle 1 im Ras-Protein befinden.

Als halb-flexible Reste wurden die Aminosäuren ausgewählt, die sich in den, an die Bindungsstelle 1 angrenzenden *Loop*-Regionen des P-*Loop* und den beiden Schalterregionen I und II befinden. Die Aminosäuren, deren Signale in den 2D-NMR-Untersuchungen von ^{15}N -Ras(T35A) mit Zn^{2+} - und Cu^{2+} -Cyclen (Kapitel 4.3.4) Verschiebungen und Verbreiterungen aufwiesen, wurden als flexibel definiert.

Zum Start der Rechnungen wurden, nach Absprache mit dem Entwickler des HADDOCK-Skripts, A.M.J.J. Bonvin (Universität Utrecht, Niederlande), die Energiebegrenzungen für die Einhaltung der Abstandstabelle um den Faktor 10 erhöht. Diese Energiebegrenzungen sind in den Voreinstellungen von HADDOCK für die Protein-Protein-Komplexberechnung niedrig eingestellt, da bei diesen

Berechnungen meist keine genauen Abstandsinformationen bekannt sind.

Für die abschließende Berechnung der wurden 1000 Wiederholungsschritte für das *rigid body docking*, 200 Wiederholungsschritte für das *semi flexible annealing* und 200 Wiederholungsschritte für die abschließende Wasserverfeinerung der Struktur durchgeführt, um ein breites Spektrum an Komplexen zu simulieren.

Als Ergebnis dieser Rechnungen wurde die energetisch günstigste Struktur aus 200 berechneten Strukturen nach der Wasserverfeinerung ausgewählt, da diese Struktur die Komplexstruktur von Cu^{2+} -Cyclen und Ras·GppNHp im Zustand 1 wohl am besten wiedergibt. Die *Backbone*-Überlagerung der berechneten Struktur mit der Kristallstruktur von Ras(wt)·GppNHp (Pai et al. 1990) (**Abb. 4.4.2**) zeigt eine gute Übereinstimmung im Proteinrückgrat der beiden Strukturen in den Bereichen, die nicht von der Bindung der Cyclene betroffen sein sollten. In den betroffenen Bereichen, wie dem P-Loop und den Schalter I und II Regionen ist zu erkennen, dass die beiden Strukturen erwartungsgemäß etwas verändert vorliegen.

Noch besser sind diese Abweichungen jedoch in den Oberflächendarstellungen der beiden Strukturen (**Abb. 4.4.3**) zu erkennen. Dort befindet sich vor allem das Tyr32 nicht mehr in der Position, in der es im konformationellen Zustand 2 vorliegt. Ein Grund dafür könnte sein, dass das Tyr32 vom gebundenen Cu^{2+} -Cyclen etwas aus seiner Position verdrängt wird. Eine Veränderung der Lage des Tyr32 wurde schon bei Geyer *et al.* (1996) zur Erklärung der Verschiebungsänderungen zwischen Zustand 1 und Zustand 2 des Ras-Proteins in den ^{31}P -NMR-Spektren postuliert. Auch Hall *et al.* (2002) konnten zeigen, dass sich das Tyr32 in der Struktur der von ihnen verwendeten Ras(A59G)-Mutante nicht mehr in der Position befindet, in der es in der Ras(wt)-Struktur vorliegt. Durch diese veränderte Lage des Tyr32 in der berechneten Ras(T35A)-Struktur wird die Struktur an dieser Stelle etwas aufgeweitet und liegt daher etwas „offener“ vor. Dazu trägt auch die Verlagerung des Glu63 bei, das in der berechneten Struktur etwas vom Nukleotid weggeklappt ist. Auch im Bereich der Bindungsstelle 2 um das His27 zeigen sich kleine Änderungen in der berechneten Struktur.

Zusätzlich zur Koordination an das γ -Phosphat scheint das Cu^{2+} -Cyclen in der berechneten Struktur noch über H-Brücken an das Protein gebunden zu sein. Im Ausschnitt der Bindungsstelle der berechneten Struktur von Ras(T35A) weisen alle vier Aminprotonen des Cyclengrundkörpers Abstände von 2.0 Å bis 2.4 Å

jeweils zwischen einem Aminproton und den Carbonyl-Sauerstoffatom der Aminosäuren Gly12, Asp33, Ala35 bzw. Ala59 auf. Dadurch könnten auch die starken Verschiebungen der Signale der benachbarten Aminosäuren Gly13, Ile36 und Gly60 in den 2D-NMR-Untersuchungen mit Zn^{2+} -Cyclen erklärt werden.

Insgesamt kann mit der berechneten Struktur des Ras(T35A) im Komplex mit Cu^{2+} -Cyclen gezeigt werden, dass die Schalter I und II Regionen etwas vom Nukleotid weggeklappt sind, wodurch das Cyclen mehr Platz im Bereich des γ -Phosphats des gebundenen Nukleotids erhält.

5.5 Synthese der Verbindungen

Wie in der Einleitung beschrieben, werden Cyclene und vor allem Zn^{2+} -Cyclenderivate häufig in der molekularen Erkennung eingesetzt. Dabei werden sowohl Monosubstituierte wie auch mehrfach substituierte Cyclene verwendet. Die meisten Substitutionsreaktionen am Cyclengrundkörper werden an den Aminstickstoffen durchgeführt, die durch einfache Reaktionen, wie S_N -Reaktionen oder Peptidkupplungen zugänglich sind.

Um nun das Cyclen nur an einer Stelle zu substituieren, müssen die übrigen drei äquivalenten Amine des Cyclens zunächst geschützt werden. Dazu eignet sich die Boc-Schutzgruppe, die unter einfachen Bedingungen eingeführt werden kann und in hohen Ausbeuten das dreifach Boc-geschützte Cyclen ergibt (Brandes *et al.* 1996). Auch die Umsetzungen mit den zwei eingesetzten *Spacer*-Molekülen, der Acetylgruppe und dem Ethylenamin, sind in der Literatur ausgiebig beschrieben (Jeon *et al.* 2002, Reichenbach-Klinke *et al.* 2002). Diese zwei Verbindungen, **3** und **5** (siehe Kapitel 4.5), dienten in der weiteren Synthese der Cyclenderivate als Ausgangsverbindungen.

Über die Darstellung der beiden Zn^{2+} -Cyclenderivate **23** und **25** wurde im Ergebnisteil dieser Arbeit bereits diskutiert (siehe Kapitel 4.5.2). Daher wird hier darauf nicht weiter eingegangen.

Eine einfache aber dennoch wichtige Synthese war die Darstellung des Mantmarkierten Zn^{2+} -Cyclens **52**. Durch die Verwendung von Mantanhydrid konnte bei der Synthese von **50** auf die Standardreagenzien für Peptidkupplungen verzichtet werden. Die weiteren Reaktionen, die Entschützung, die Deprotonierung mit Hilfe

eines Ionenaustauschers und die Umsetzung mit Zn(II)-Chlorid waren standardisierte Reaktionen, wie sie bei der Synthese von Cyclenderivaten oft durchgeführt werden. Zusammenfassend konnte die Verbindung **52** in vier Schritten aus der Verbindung **5** mit einer guten Gesamtausbeute von 40% erhalten werden.

Die Synthese der Verbindungen mit den natürlichen Aminosäureresten wurde unter Verwendung von Standardreagenzien der Peptidkupplung mit orthogonalen Schutzgruppen durchgeführt. Dabei wurden für die ersten Aminosäureumsetzungen die Fmoc-geschützten L-Alanin und L-Phenylalanin in Literatur-bekannten Synthesen mit dem Boc₃-Cyclen-EA (**5**) umgesetzt und anschließend mit TBAF entschützt (Ritter *et al.* 2005). Außerdem wurde das Boc₃-Cyclen-Ac (**3**) mit den durch Methylester geschützten Aminosäuren L-Valin und Glycin umgesetzt und anschließend mit LiOH zu den Verbindungen **211** und **213** entschützt. Die dabei durchgeführten Reaktions- und Aufreinigungsschritte sind ebenfalls Standard in der Peptidchemie und liefen unter guten Ausbeuten ab. Um auch das Bindungsverhalten von Cyclenderivaten mit einer Aminosäure als Rest untersuchen zu können, wurden alle vier Verbindungen (**111**, **112**, **211** und **213**) entschützt und mit ZnCl₂ in guten Ausbeuten komplexiert. Vor der Komplexierung mit dem Zn(II)-Ion wurden allerdings die Cyclenamine, die nach der Entschätzung mit HCl-gesättigten Diethylether als Ammoniumchloride vorliegen, mit wässriger NaOH-Lösung deprotoniert.

Um sicher zu gehen, dass die chiralen Zentren der Verbindungen durch die Deprotonierung der Cyclenamine nicht racemisiert wurden, wurden die optischen Drehwerte der Verbindungen **131** ($[\alpha]_D^{20} = +4.0^\circ$), **132** ($[\alpha]_D^{20} = +21^\circ$) und **231** ($[\alpha]_D^{20} = -4.6^\circ$) in Methanol gemessen. Bei diesen Messungen zeigten alle drei Verbindungen einen optischen Drehwert, was bedeutet, dass die Verbindungen zumindest nicht vollständig racemisiert vorliegen. Die niedrigen Drehwerte für das Alanin- und das Valinderivat können dadurch erklärt werden, dass die Aminosäuren selbst nur einen geringen Drehwert aufzeigen. Im Buch von Hesse *et al.* (1995) ist dazu ein optischer Drehwert für das Alanin in Wasser von $[\alpha]_D^{20} = +2.7^\circ$ aufgeführt.

Für die Synthese der Dipeptid-Cyclenderivate wäre es auch möglich gewesen, die Dipeptide zuerst zu synthetisieren und sie anschließend mit dem Cyclengrundkörper über die verwendeten *Spacer* zu verbinden. Da jedoch auch

die Bindung der Monoaminosäure-Cyclenderivate an das Ras-Protein untersucht werden sollte, wurden die Dipeptid-Cyclenderivate schrittweise synthetisiert. Dazu wurden drei der synthetisierten Monoaminosäure-Cyclenderivate, die Verbindungen **111**, **112** und **211** eingesetzt.

Zur Synthese der Verbindungen **331** bis **334** wurden die Verbindungen **111** und **112** jeweils mit Boc-L-Asp(OBzl)-OH und Boc-L-Lysin(Boc)-OH umgesetzt, um in möglichst wenigen Schritten die jeweiligen Zn^{2+} -Cyclen-Dipeptidderivate zu erhalten. Die Benzylester der Asparaginsäurederivate **301** und **303** mussten vor der Entschützung der Boc-Gruppen noch mit LiOH in wässrigen Lösungen entschützt werden. Anschließend wurden die Boc-Schutzgruppen aller Verbindungen (**302**, **304**, **311** und **313**) mit HCl-gesättigtem Diethylether entschützt und mit ZnCl_2 komplexiert. Die Gesamtausbeuten ausgehend von den Verbindungen **111** und **112** liegen für die vier bzw. fünf Reaktionsschritte mit 64% für **331**, 11% für **332**, 42% für **333** und 28% für **334** in einem guten Bereich. Die zwei etwas schlechteren Gesamtausbeuten von **332** und **334** können durch die Ausbeuteverluste bei der ersten Umsetzung (bei **332**) und am Ionenaustauscher (bei **334**) erklärt werden. Auch bei den Synthesen der Verbindungen **331**, **332** und **333** wurden die Cyclenamine, die nach der Entschützung der Boc-Gruppen als Ammoniumchloride vorliegen, vor der Komplexierung mit dem Zn(II) -Ion mit wässriger NaOH-Lösung deprotoniert.

Zur Überprüfung, ob die chiralen Zentren der Verbindungen nicht durch die Einwirkung der verdünnten Natronlauge racemisiert wurden, wurden die Aufspaltungsmuster der H_β -Protonensignale in den ^1H -NMR-Spektren und die C_α -Signale ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektren untersucht.

Dabei zeigten die Signale der Verbindungen **332** und **333** die erwarteten Aufspaltungen. Im ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung **332** sind die H_β -Protonen des Alaninrests durch das H_α -Proton in ein Dublett aufgespalten. Zudem weist sowohl das C_α -Signal des Alanins als auch das C_α -Signal des Lysins jeweils nur ein Signal im ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum auf. Bei Verbindung **333** sind sowohl die H_β -Protonen des Phenylalaninrests, als auch die des Aspartatrests im ^1H -NMR-Spektrum jeweils in ein Dublett aufgespalten. Die Auswertungen der NMR-Spektren beweisen daher, dass die Verbindungen **332** und **333** in ihren isomerenreinen Formen vorliegen.

Dagegen liegen die Verbindungen **331** und **334** nicht mehr vollständig in den

isomerenreinen Formen vor. Bei Verbindung **331** liegen sowohl die Methylgruppe des Alanins, als auch die H_β -Protonen des Aspartatrests im ^1H -NMR-Spektrum in jeweils zwei Dubletts aufgespalten vor. Da jedoch die beiden Dubletts jeweils nicht die identische Intensität aufweisen, kann eine vollständige Isomerisierung der Verbindung **331** ausgeschlossen werden. Ebenso weist die Verbindung **334** zwei unterschiedlich intensive Signale im ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum für das H_α -Proton des Phenylalanins auf. Diese Signale bestätigen eine teilweise Racemisierung des Phenylalaninrests. Der Lysinrest ist hingegen nicht von einer Racemisierung betroffen und zeigt das erwartete einzelne Signal im ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum.

Als letztes wurden die Cyclenderivate **431** und **432** synthetisiert. Dazu wurde die Verbindung **211** mit L-Lysin(Boc)-OMe und L-Asp(O^tBu)-O^tBu jeweils als HCl-Salz umgesetzt. Zur weiteren Umsetzung wurden zunächst die Ester der entstandenen Verbindungen **411** und **412** mit LiOH entschützt. Anschließend wurden die Boc-Gruppen entfernt und die Verbindungen mit ZnCl_2 komplexiert. Über alle Reaktionsschritte hinweg belaufen sich die Gesamtausbeuten ausgehend von der Verbindung **211** auf 57% für **431** und 52% für **432**. Dabei liegen die Ausbeuten der einzelnen Reaktionsschritte jeweils über 80%. Wie bei den meisten anderen vorgestellten Komplexierungen mussten auch bei den Verbindungen **431** und **432** zunächst die Cyclenamine mit wässriger NaOH-Lösung deprotoniert werden, bevor die Umsetzung mit dem ZnCl_2 durchgeführt werden konnte.

Deshalb wurden auch diese beiden Zn^{2+} -Cyclenderivate mit Hilfe der NMR-Spektroskopie auf ihre Stereochemie hin untersucht. Bei Verbindung **431** zeigten sowohl das H_α -Signal des Valinrests als auch das H_α -Signal des Lysinrests jeweils zwei Signale unterschiedlicher Intensität im ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum. Dies deutet darauf hin, dass die Verbindung **431** nicht isomerenrein, jedoch auch nicht vollständig racemisiert vorliegt. Dagegen zeigt das ^1H - ^{13}C -HSQC-Spektrum der Verbindung **432** jeweils nur ein Signal für die C_α -Gruppe des Valin- und des Aspartatrests auf und weist somit keinerlei Anzeichen für eine Isomerisierung auf.

Da der Einfluss der Reste der Cyclenderivate auf die Bindung zum Ras-Protein untersucht werden soll, ist deren Stereochemie für diese Arbeit nicht von allzu großer Bedeutung. Daher ist die teilweise Racemisierung der Verbindungen **331**, **334** und **431** nicht optimal, jedoch auch nicht von Nachteil für die ersten Untersuchungen.

5.6 WaterLOGSY-Untersuchungen

Mit Hilfe der WaterLOGSY-Methode (**Water-Ligand Observed via Gradient SpectroscopY**) lässt sich die Bindung eines Liganden an ein Protein schnell untersuchen. Diese Methode, entwickelt von C. Dalvit (1998) (Dalvit *et al.* 2001), beruht auf dem Magnetisierungstransfer von angeregten Wassermolekülen auf den ungebundenen Liganden und über das Protein auf den gebundenen Liganden. Dabei besitzt der NOE-Transfer auf den ungebundenen Liganden ein entgegengesetztes Vorzeichen als der des gebundenen Liganden. Mittels eines Differenzspektrums kann dann sichtbar gemacht werden, ob der Ligand an das Protein bindet oder nicht. Zudem können mehrere Liganden gleichzeitig untersucht werden, wenn die chemischen Verschiebungen der einzelnen Verbindungen bekannt sind.

Mit Hilfe von WaterLOGSY-Spektren können auch Verdrängungsexperimente ausgewertet werden, da aus den Intensitätsänderungen der Ligandensignale auf die relativen Bindungsaffinitäten der Liganden untereinander rückgeschlossen werden kann.

In dieser Arbeit wurden eine Vielzahl von Verbindungen, meist auf Basis des Cyclens mit Hilfe der WaterLOGSY-Methode auf die Bindung an das Ras-Protein hin untersucht. Ein Teil dieser Verbindungen wurde im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert (Kapitel 4.5). Der andere Teil wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. König zur Verfügung gestellt.

In allen Untersuchungen zeigten die Cyclenderivate ohne Zn(II) als Zentralion keinerlei Bindung zu Ras(T35A)·GppNHp auf. Die Verbindungen mit Ni(II) oder Co(III) als Zentralion wiesen ebenfalls keine Affinität zum Ras-Protein auf. Da in den NMR-Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass Cu²⁺-Cyclen an das Protein bindet, kann gefolgert werden, dass sowohl das Zn(II)- als auch das Cu(II)-Ion wichtig für die Bindung der Cyclenderivate an das Ras-Protein sind.

In den ersten WaterLOGSY-Untersuchungen der zur Verfügung gestellten Verbindungen wiesen außer dem Zn²⁺-Cyclen noch zwei weitere Zn²⁺-Cyclenderivate eine Bindung an das Ras-Protein auf. Diese konnten in den Verdrängungsexperimenten jedoch nicht das Zn²⁺-Cyclen aus dem Komplex mit dem Ras-Protein verdrängen.

In den Bindungsuntersuchungen der synthetisierten Verbindungen (Kapitel 4.5)

zeigten nahezu alle Cyclenderivate zumindest schwach positive Signale in den *WaterLOGSY*-Spektren. Die drei Verbindungen TG-ZC-052, TG-ZC-331 und TG-ZC-333 wiesen dabei deutliche, positive Signale auf, sodass sie für weitere Verdrängungsexperimente von Zn^{2+} -Cyclen eingesetzt wurden.

In diesen Experimenten konnten die Verbindungen TG-ZC-052 und TG-ZC-333 das Zn^{2+} -Cyclen zumindest teilweise aus dem Komplex mit Ras(T35A)-GppNHp verdrängen.

Damit wurden in dieser Arbeit zwei neue Zn^{2+} -Cyclenderivate synthetisiert, die besser an das Ras-Protein im konformationellen Zustand 1 binden als das Zn^{2+} -Cyclen.

5.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage für ein anschließendes Projekt in dem die Bindung der Cyclene, insbesondere der zwei besser bindenden Zn^{2+} -Cyclenderivate TG-ZC-052 und TG-ZC-333 mit Hilfe der 2D-NMR-Spektroskopie an ^{15}N -markiertem Protein weiter charakterisiert werden können. Vor allem die Bindung der Derivate an die Ras(G12V)-Mutante ist äußerst interessant für die angestrebte Inhibierung von onkogenem Ras.

In diesem Zusammenhang kann mit Hilfe von HADDOCK auch die Struktur der zwei Cyclenderivate im Komplex mit Ras-Mutanten wie G12V berechnet werden, um den Einfluss der Substituenten besser beurteilen zu können. Aufgrund dieser Komplexstrukturen können anschließend auch neue Verbindungen synthetisiert werden, die spezifischer an die Bindungsstelle 1 des Ras-Proteins binden.

Des weiteren könnte im Rahmen dieses Projekts mittels der *WaterLOGSY*-NMR-Spektroskopie die Bindung von neuen Derivaten untersucht werden, die nicht auf Zn^{2+} -Cyclen basieren.

6 Zusammenfassung

Das Ras-Protein spielt eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion. Dort nimmt es die Funktion eines molekularen Schalters ein, der in zwei Konformationen (an und aus) an der Plasmamembran gebunden vorliegt. Zn^{2+} - und Cu^{2+} -Cyclen binden an das Ras-Protein mit einer Affinität im millimolaren Bereich. Mit Hilfe von fluoreszenzspektroskopischen und ^{31}P -NMR-spektroskopischen Untersuchungen an Ras(wt) und dessen Mutanten T35A und G12V wird gezeigt, dass das Zn^{2+} -Cyclen eine etwa 10-fach höhere Bindungsaffinität zum Ras-Protein aufweist als das Cu^{2+} -Cyclen.

Aus den ^{31}P -NMR-Messungen kann eine Bindungsstelle bereits bestimmt werden. Diese befindet sich im Bereich des aktiven Zentrums des Proteins nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids. An diese Stelle binden die Cyclene jedoch nur dann, wenn sich das Ras-Protein im konformationellen Zustand 1 befindet. Das Zn^{2+} -Cyclen ist darüber hinaus in der Lage, diesen Zustand zu stabilisieren, in dem das Ras-Protein eine wesentlich geringere Affinität zu Effektor-Proteinen zeigt.

Unter Verwendung des paramagnetischen Cu^{2+} -Cyclens ist es zudem möglich, aus den ^{31}P -Relaxationszeiten die Abstände der einzelnen Phosphorkerne des Nukleotids von Ras(T35A)-GppNHp zum Cu(II)-Ion des Cyclens zu bestimmen. Dabei ergeben sich Abstände von 3.0 Å zum γ -Phosphor, 4.8 Å zum β -Phosphor und 5.4 Å zum α -Phosphor des GppNHp.

Durch ^1H - ^{15}N -TROSY-NMR-Experimente an ^{15}N -markiertem Ras(T35A)-GppNHp können zwei weitere Bindungsstellen für die Cyclene am Protein ermittelt werden. Es kann gezeigt werden, dass sowohl das Zn^{2+} -Cyclen als auch das Cu^{2+} -Cyclen an die gleichen Regionen des Ras-Proteins binden, die sich am γ -Phosphat des Nukleotids (repräsentiert durch Ile36), im Bereich des His27 und im Bereich des Asp108 befinden. Mittels der Änderungen in den chemischen Verschiebungen der ^{15}N -Kerne kann in diesen Experimenten zudem die Bindungskonstanten für das Zn^{2+} -Cyclen an die ausgewählten Aminosäuren der einzelnen Bindungsstellen berechnet werden. Die Werte der Dissoziationskonstanten der einzelnen Bindungsstellen zeigen, dass das Zn^{2+} -Cyclen am besten an die Bindungsstelle im Bereich des Asp108 ($K_D = 0.6 \text{ mM}$) bindet. Für die anderen beiden Bindungsstellen betragen die Dissoziationskonstanten 4.2 mM (His27) und

6.7 mM (Ile36).

Um die Bindungsaffinität der Cyclenderivate zu steigern, muss zumindest eine dieser Bindungsstellen genauer charakterisiert werden. Dazu wird Moleküldynamik-Rechnungen unter Verwendung des Programms HADDOCK in CNS durchgeführt, um eine Struktur des Ras-Cyclen-Komplexes zu erhalten. Dabei gehen die Ergebnisse der zwei-dimensionalen NMR-Untersuchungen am Ras-Protein und die Ergebnisse der Relaxationszeitmessungen mit dem paramagnetischen Cu^{2+} -Cyclen in die Berechnungen ein. Mit Hilfe dieser Ergebnisse kann eine Struktur des Ras(T35A)·GppNHp- Cu^{2+} -Cyclen-Komplexes berechnet werden, in der das Cyclen im Bereich des aktiven Zentrums des Ras-Proteins im Zustand 1 bindet.

Basierend auf dieser Komplexstruktur wird der Cyclengrundkörper mit unterschiedlichen Derivaten monosubstituiert, um eine kleine Bibliothek von 13 Verbindungen zu synthetisieren. Ziel dieser Synthesen ist es, die Affinität der Verbindungen zum Ras-Protein im Vergleich zum Zn^{2+} -Cyclen zu steigern.

Aus den abschließenden Untersuchungen der synthetisierten Zn^{2+} -Cyclenderivate mit Hilfe der *WaterLOGSY*-NMR-Spektroskopie gehen zwei Verbindungen (TG-ZC-052 und TG-ZC-333) hervor, die mit höherer Affinität als das Zn^{2+} -Cyclen an das Ras-Protein binden.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wird gezeigt, dass Zn^{2+} -Cyclen eine vielversprechende Leitstruktur für eine pharmakologische Inhibierung der vom Ras-Protein abhängigen Signaltransduktion darstellt.

7 Literaturverzeichnis

- S. Aoki, K. Iwaida, N. Hanamoto, M. Shiro & E. Kimura** (2002) Guanidine Is a Zn^{2+} -Binding Ligand at Neutral pH in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 5256-5257.
- S. Aoki, A. Jikiba, K. Takeda & E. Kimura** (2004) A zinc(II) complex-conjugated polymer for selective recognition and separation of phosphates. *J. Phys. Org. Chem.* **17**, 489-497.
- S. Aoki & E. Kimura** (2000) Highly Selective Recognition of Thymidine Mono- and Diphosphate Nucleotides in Aqueous Solution by Ditopic Receptors Zinc(II)-Bis(cyclen) Complexes (Cyclen = 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane). *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4542-4548.
- S. Aoki & E. Kimura** (2000) Recent progress in artificial receptors for phosphate anions in aqueous solution. *Rev. Mol. Biotech.* **90**, 129-155.
- S. Aoki & E. Kimura** (2004) Zinc-Nucleic Acid Interaction. *Chem. Rev.* **104**, 769-787.
- F. Arnesano, L. Banci, I. Bertini, I.C. Felli, C. Luchinat & A.R. Thompson** (2003) A Strategy for the NMR Characterization of Type II Copper(II) Proteins: the Case of the Copper Trafficking Protein CopC from *Pseudomonas Syringae*. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7200-7208.
- Autorenkollektiv** (1988), Organikum. *VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften* **17. Auflage**, Berlin.
- B.F. Baker, H. Khalili, N. Wei & J.R. Morrow** (1997) Cleavage of the 5' Cap Structure of mRNA by a Europium(III) Macrocyclic Complex with Pendant Alcohol Groups. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 8749-8755.
- M. Barbacid** (1987) Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 779-827.
- D. Barnard, H. Sun, L. Baker & M.S. Marshall** (1998) In vitro inhibition of Ras-Raf association by short peptides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **247**, 176-180.
- S. Brandes, C. Gros, F. Denat, P. Pullumbi & R. Guillard** (1996) New facile and convenient synthesis of bispolyazamacrocycles using Boc protection. Determination of geometric parameters of dinuclear copper(II) complexes using ESR spectroscopy and molecular mechanics calculations. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **133**, 65-73.
- A.T. Brunger, P.D. Adams, G.M. Clore, W.L. DeLano, P. Gros, R.W. Grosse-Kunstleve, J.S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N.S. Pannu, R.J. Read, L.M. Rice, T. Simonson & G.L. Warren** (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905-921.
- N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann & R. Huber** (1995) High-leveled biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **230**, 788-796.
- G.J. Clark, J.K. Drugan, R.S. Terrell, C. Bradham, C.J. Der, R.M. Bell & S. Campbell** (1996) Peptides containing a consensus Ras binding sequence from Raf-1 and the GTPase activating protein NF1 inhibit Ras function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 1577-1581.
- K.A. Connors** (1987) Binding constants: the measurement of molecular complex stability. *Wiley-Verlag* **3. Auflage**, New York.

- M. Czisch & R. Boelens** (1998) Sensitivity enhancement in the TROSY experiment. *J. Magn. Reson.* **134**, 158-160.
- C. Dalvit** (1998) Efficient multiple-solvent suppression for the study of the interactions of organic solvents with biomolecules. *J. Biomol. NMR.* **11**, 437-444.
- C. Dalvit, G. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesi & B. Stockman** (2001) WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: Practical aspects and range of applicability. *J. Biomol. NMR.* **21**, 349-359.
- C. Dalvit, P. Pevarello, M. Tatò, M. Veronesi, A. Vulpetti & M. Sundstroem** (2000) Identification of compounds with binding affinity to proteins via magnetization transfer from bulk water. *J. Biomol. NMR* (2000) **18**, 65-68.
- A.E. Derome & M.P. Williamson** (1990) Rapid-pulsing artifacts in double-quantum-filtered COSY. *J. Magn. Reson.* **88**, 177-185.
- A.D.J. van Dijk, R. Boelens & A.M.J.J. Bonvin** (2005) Data-driven docking for the study of biomolecular complexes. *FEBS Journal* **272**, 293-312.
- C. Dominguez, R. Boelens & A.M.J.J. Bonvin** (2003) HADDOCK: A Protein-Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1731-1737.
- R.A. Dwek** (1973) Nuclear Magnetic Resonance (N.M.R) in Biochemistry – Applications to Enzyme Systems. *Clarendon Press*, Oxford.
- L. Fielding, S. Rutherford & D. Fletcher** (2005) Determination of protein-ligand binding affinity by NMR: observations from serum albumin model systems. *Magn Reson Chem.* **43**, 463-470.
- B. Ford, K. Skowronek, S. Boykevich, D. Bar-Sagi & N. Nassar** (2005) Structure of the G60A mutant of Ras: implications for the dominant negative effect. *J. Biol. Chem.* **280**, 25697-25705.
- M. Geyer, C. Herrmann, S. Wohlgemuth, A. Wittinghofer & H.R. Kalbitzer** (1997) Structure of the Ras-binding domain of RalGEF and implications for Ras binding and signaling. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 694-699.
- M. Geyer, T. Schweins, C. Herrmann, T.F. Prisner, A. Wittinghofer & H.R. Kalbitzer** (1996) Conformational Transitions in p21(Ras) and in its Complexes with the Effector Protein Raf-RBD and the GTPase. *Biochemistry* **35**, 10308-10320.
- P.J. Geyer, R. Doker, W. Kremer, X. Zhao, J. Kuhlmann & H.R. Kalbitzer** (2005) Solution structure of the Ran-binding domain 2 of RanBP2 and its interaction with the C terminus of Ran. *J Mol Biol.* **348**, 711-725.
- F.M. Giardiello** (1994) Sulindac and polyp regression. *Cancer Metastasis Rev.* **13**, 279-283.
- H.E. Gottlieb, V. Kotlyar & A. Nudelman** (1997) NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J Org Chem.* **62**, 7512-7515.
- W. Gronwald, F. Huber, P. Grünwald, M. Spörner, S. Wohlgemuth, C. Herrmann, A. Wittinghofer & H.R. Kalbitzer** (2001) Solution structure of the Ras binding domain of the protein kinase Byr2 from *Schizosaccharomyces pombe*. *Structure* **9**, 1029-1041.
- P. Güntert, C. Mumenthaler & K. Wüthrich** (1997) Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* **273**, 283-298.

- J.F. Hancock, H. Paterson & C.J. Marshall** (1990) A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell*. **63**, 133-139.
- K.H. Hausser & H.R. Kalbitzer** (1989) NMR für Mediziner und Biologen: Strukturbestimmung, Bildgebung, In-vivo-Spektroskopie. *Springer-Verlag Berlin*. **1. Auflage**, Heidelberg.
- C. Herrmann** (2003) Ras-effector interactions: after one decade. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 122-129.
- C. Herrmann, C. Block, C. Geisen, K. Haas, C. Weber, G. Winde, T. Mörröy & O. Müller** (1998) Sulindac sulfide inhibits Ras signaling. *Oncogene* **17**, 1769-1776.
- C. Herrmann & N. Nassar** (1996) Ras and its Effectors. *Prog. Biophys. molec. Biol.* **66**, 1-41.
- M. Hesse, H. Meier & B. Zeeh** (1995) Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York*. **5. Auflage**, Stuttgart.
- T. Hiratsuka** (1983) New ribose-modified fluorescent analogs of adenine and guanine nucleotides available as substrates for various enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*. **742**, 496-508.
- S. Hünig, G. Märkl & J. Sauer** (1990) Einführung in die apparativen und spektroskopischen Methoden in der Organischen Chemie. Regensburg, Würzburg. **4. Auflage**, Regensburg.
- J.W. Jeon, S.J. Son, C.E. Yoo, I.S. Hong, J.B. Song & J. Suh** (2002) Protein-Cleaving Catalyst Selective for Protein Substrate. *Org. Lett.* **4**, 4155-4158.
- J. John, H. Rensland, I. Schlichting, I. Vetter, G. D. Borasiog, R.S. Goody & A. Wittinghofer** (1993) Kinetic and Structural Analysis of the Mg²⁺-binding Site of the Guanine Nucleotide-binding Protein p21^{U-ras}. *J. Biol. Chem.* **268**, 923-929.
- J. John, R. Sohmen, J. Feuerstein, R. Linke, A. Wittinghofer & R.S. Goody** (1990) Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry* **29**, 6058-6065.
- N. Kachel, K.S. Erdmann, W. Kremer, P. Wolff, W. Gronwald, R. Heumann & H.R. Kalbitzer** (2003) Structure Determination and Ligand Interactions of PDZ2b Domain of PTP-Bas (hPTP1E): Splicing-induced Modulation of Ligand Specificity. *J. Mol. Biol.* **334**, 143-155.
- I.-M. Karaguni, K.-H. Glüsenkamp, A. Langerak, C. Geisen, V. Ullrich, G. Winde, T. Mörröy & O. Müller** (2002) New Indene-Derivatives with Anti-Proliferative Properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 709-713.
- J. Kato-Stankiewicz, I. Hakimi, G. Zhi, J. Zhang, I. Serebriiskii, L. Guo, H. Edamatsu, H. Koide, S. Menon, R. Eckl, S. Sakamuri, Y. Lu, Q.Z. Chen, S. Agarwal, W.R. Baumbach, E.A. Golemis, F. Tamanoi & V. Khazak** (2002) Inhibitors of Ras/Raf-1 interaction identified by two-hybrid screening revert Ras-dependent transformation phenotypes in human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 14398-14403.
- L. Kay, P. Keifer & T. Saarinen** (1992) Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10663-10665.
- D.H. Kim & S.S. Lee** (2000) Origin of Rate-Acceleration in Ester Hydrolysis with Metalloprotease Mimics. *Bioorg. Med. Chem.* **8** 647-652.

- E. Kimura, S. Aoki, T. Koike & M. Shiro** (1997) A Tris(Zn^{II}-1,4,7,10-tetraazacyclododecane) Complex as a New Receptor for Phosphate Dianions in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3068-3076.
- B. König, M. Pelka, M. Subat, I. Dix & P.G. Jones** (2001) Urea Derivatives of 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane - Synthesis and Binding Properties. *Eur. J. Org. Chem.* **10**, 1943-1949.
- T. Koike, S. Kajitani, I. Nakamura, E. Kimura & M. Shiro** (1995) The Catalytic Carboxyester Hydrolysis by a New Zinc(II) Complex with an Alcohol-Pendant Cyclen (1-(2-Hydroxyethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane): A Novel Model for Indirect Activation of the Serine Nucleophile by Zinc(II) in Zinc Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 1210-1219.
- T. Koike, T. Watanabe, S. Aoki, E. Kimura & M. Shiro** (1996) A Novel Biomimetic Zinc(II)-Fluorophore, Dansylamidoethyl-Pendant Macrocyclic Tetraamine 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane (Cyclen). *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12696-12703.
- M. Kruppa** (2005) Coordinative Peptide Recognition – Making Intermolecular Processes Intramolecular. *Dissertation*, Universität Regensburg.
- M. Kruppa, D. Frank, H. Leffler-Schuster, B. König** (2006) Screening of metal complex-amino acid side chain interactions by potentiometric titration. *Inorg. Chim. Acta.* **359**, 1159-1168.
- U.K. Laemmli** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- T. Linnemann, M. Geyer, T. Jaitner, C. Block, H.R. Kalbitzer, A. Wittinghofer & C. Herrmann** (1999) Thermodynamic and kinetic characterization of the interaction between the Ras binding domain of AF6 and members of the Ras subfamily. *J. Biol. Chem.* **274**, 13556-13562.
- T. Maurer & H.R. Kalbitzer** (1996) Indirect Referencing of ³¹P and ¹⁹F NMR Spectra. *J. Magn. Reson.* **B113**, 177-178.
- A. Meissner, T. Schulte-Herbrueggen, J. Briand & O.W. Sorensen** (1998) Double spin-state-selective coherence transfer. Application for twodimensional selection of multiplet components with long transverse relaxation times. *Mol. Phys.* **95**, 1137-1142.
- M.V. Milburn, L. Tong, A.M. deVos, A. Brunger, Z. Yamaizumi, S. Nishimura & S.H. Kim** (1990) Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* **247**, 939-945.
- J.R. Morrow, K. Aures & D. Epstein** (1995) Metal ion promoted attack of an alcohol on a phosphate diester: modelling the role of metal ions in RNA self-splicing reactions. *Chem. Comm.* **23**, 2431-2432.
- O. Müller, E. Gourzoulidou, M. Carpintero, I.-M. Karaguni, A. Langerak, C. Herrmann, T. Mörröy, L. Klein-Hitpaß & H. Waldmann** (2004) Identification of Potent Ras Signaling Inhibitors by Pathway-Selective Phenotype-Based Screening. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 450-454.
- N. Nassar, G. Horn, C. Herrmann, C. Block, R. Janknecht & A. Wittinghofer** (1996) Ras/Rap effector specificity determined by charge reversal. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 723-729.

- F.C. Neidhardt, P.L. Bloch & D.F. Smith** (1974) Culture medium for enterobacteria. *J. Bacteriol* **119**, 736-747
- P.R. Norman & R.D. Cornelius** (1982) Mechanism of Cobalt(III)-Promoted Hydrolysis of Triphosphate Ion. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 2356-2361.
- E.F. Pai, U. Krengel, G.A. Petsko, R.S. Goody, W. Kabsch & A. Wittinghofer** (1990) Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* **9**, 2351-2359.
- A.G. Palmer III, J. Cavanagh, P.E. Wright & M. Rance** (1991) Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **93**, 151-170.
- D.S. Raiford, C.L. Fisk & E.D. Becker** (1979) Calibration of methanol and ethylene glycol nuclear magnetic resonance thermometers. *Anal. Chem.* **51**, 2050-2051.
- M. Rance, J.P. Loria & A.G. Palmer III** (1999) Sensitivity improvement of transverse relaxation-optimized spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **136**, 91-101.
- K. Pervushin, G. Wider & K. Wuethrich** (1998) Single Transition-to-single Transition Polarization Transfer (ST2-PT) in [¹⁵N,¹H]-TROSY. *J. Biomol. NMR* **12**, 345-348.
- R. Reichenbach-Klinke & B. König** (2002) Metal complexes of azacrown ethers in molecular recognition and Catalysis. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2**, 121-130.
- R. Reichenbach-Klinke, M. Kruppa & B. König** (2002) NADH Model Systems Functionalized with Zn(II)-Cyclen as Flavin Binding Sites Structure Dependence of the Redox Reaction within Reversible Aggregates. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 12999-13007.
- S.C. Ritter, M. Eiblmaier, V. Michlova & B. König** (2005) Chiral NADH model systems functionalized with Zn(II)-cyclen as flavin binding site. *Tetrahedron* **61**, 5241-5251.
- M. Rohrer, T.F. Prisner, O. Brüggmann, H. Käss, M. Spoerner, A. Wittinghofer & H.R. Kalbitzer** (2001) Structure of the metal-water complex in Ras-GDP studied by high-field EPR spectroscopy and ³¹P NMR spectroscopy. *Biochemistry* **40**, 1884-1889.
- A.J. Scheidig, S.M. Franken, J.E. Corrie, G.P. Reid, A. Wittinghofer, E.F. Pai & R.S. Goody** (1995) X-ray crystal structure analysis of the catalytic domain of the oncogene product p21H-ras complexed with caged GTP and mant dGppNHp. *J. Mol. Biol.* **13**, 132-150.
- U. Schieborr, M. Vogtherr, B. Elshorst, M. Betz, S. Grimme, B. Pescatore, T. Langer, K. Saxena & H. Schwalbe** (2005) How Much NMR Data Is Required To Determine a Protein-Ligand Complex Structure? *Chembiochem* **6**, 1-9.
- J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky, S.J. Glaser, O.W. Sorensen & C. Griesinger** (1994) A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *J. Biomol. NMR* **4**, 301-306.
- A.J. Shaka, P.B. Baker & R. Freeman** (1985) Computer-optimized decoupling scheme for wideband applications and low-level operation. *J. Magn. Reson.* **64**, 547-552.
- M. Spörner** (2002) Konformationelle Dynamik des Ras-Proteins und ihre Bedeutung für die Effektor-Wechselwirkung. *Dissertation*, Universität Regensburg.
- M. Spoerner, T. Graf, B. König & H.R. Kalbitzer** (2005A) A novel mechanism for the modulation of Ras-effector interaction by small molecules. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* **334**, 709-713.

- M. Spoerner, C. Herrmann, I. Vetter, H.R. Kalbitzer & A. Wittinghofer** (2001) Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4944-4949.
- M. Spoerner, A. Nuehs, P. Ganser, C. Herrmann, A. Wittinghofer & H.R. Kalbitzer** (2005B) Conformational states of Ras complexed with the GTP-analogs GppNHp or GppCH₂p: implications for the interaction with effector proteins. *Biochemistry* **44**, 2225-2236.
- M. Spoerner, A. Wittinghofer & H.R. Kalbitzer** (2004) Perturbation of the conformational equilibria of Ras by selective mutations as studied by ³¹P NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* **578**, 305-310.
- J.R. Sydor, M. Engelhard, A. Wittinghofer, R.S. Goody, & C. Herrmann** (1998) Transient kinetic studies on the interaction of Ras and the Ras-binding domain of c-Raf-1 reveal rapid equilibration of the complex. *Biochemistry* **37**, 14292-14299.
- H.J. Thompson, C. Jiang, J. Lu, R.G. Mehta, G.A. Piazza, N.S. Paranka, R. Pamukcu & D.J. Ahnen** (1997) Sulfone metabolite of sulindac inhibits mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* **57**, 267-271.
- L.A. Tong, A.M. de Vos, M.V. Milburn & S.H. Kim** (1991) Crystal structures at 2.2 Å resolution of the catalytic domains of normal ras protein and an oncogenic mutant complexed with GDP. *J. Mol. Biol.* **217**, 503-516.
- J. Tucker, G. Sczakiel, J. Feuerstein, J. John, R.S. Goody & A. Wittinghofer** (1986) Expression of p21 proteins in Escherichia coli and stereochemistry of the nucleotide-binding site. *EMBO J.* **5**, 1351-1358.
- I.R. Vetter, T. Linnemann, S. Wohlgemuth, M. Geyer, H.R. Kalbitzer, C. Herrmann & A. Wittinghofer** (1999) Structural and biochemical analysis of Ras-effector signaling via RalGDS. *FEBS Lett.* **451**, 175-180.
- H. Waldmann, I.-M. Karaguni, M. Carpintero, E. Gourzoulidou, C. Herrmann, C. Brockmann, H. Oshkinat & O. Müller** (2004) Sulindac-Derived Ras Pathway Inhibitors Target the Ras-Raf Interaction and Downstream Effectors in the Ras Pathway. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 454-458.
- J. Weigelt** (1998) Single Scan, Sensitivity- and Gradient-Enhanced TROSY for Multidimensional NMR Experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 10778-10779.
- M.A. White, T. Vale, J.H. Camonis, E. Schaefer & M.H. Wigler** (1996) A role for the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator in mediating Ras-induced transformation. *J. Biol. Chem.* **271**, 16439-16442.
- D.S. Wishart, C.G. Bigam, J. Yao, F. Abildgaard, H.J. Dyson, E. Oldfield, J.L. Markley & B.D. Sykes** (1995) ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR.* **6**, 135-140.
- A. Wittinghofer & N. Nassar** (1996) How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 488-491.
- A. Wittinghofer & H. Waldmann** (2000) Ras-A Molecular Switch Involved in Tumor Formation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 4192-4214.

- C.W. Xu & Z. Luo** (2002) Inactivation of Ras function by allele-specific peptide aptamers. *Oncogene* **21**, 5753-5757.
- M. Ye, F. Shima, S. Muraoka, J. Liao, H. Okamoto, M. Yamamoto, A. Tamura, N. Yagi, T. Ueki & T. Kataoka** (2005) Crystal Structure of M-Ras Reveals a GTP-bound "Off" State Conformation of Ras Family Small GTPases. *J. Biol. Chem.* **280**, 31267–31275.
- J. Zeng, T. Nheu, A. Zorzet, B. Catimel, E. Nice, H. Maruta, A.W. Burgess & H.R. Treutlein** (2001) Design of inhibitors of Ras-Raf interaction using a computational combinatorial algorithm. *Prot. Eng.* **14**, 39-45.
- G. Zhu, X.M. Kong & K.H. Sze** (1999) Gradient and sensitivity enhancement of 2D TROSY with water flip-back, 3D NOESY-TROSY and TOCSY-TROSY experiments. *J. Biomol. NMR* **13**, 77-81.

8 Abkürzungsverzeichnis

| | | |
|-----------------------------|---|---|
| Ala | = | Alanin |
| Ar | = | Aromat |
| AS | = | Aminosäure |
| Asp | = | Asparaginsäure |
| Boc | = | ^t Butylcarbonylrest |
| Boc-L-Asp(OBzl)-OH | = | N- ^t Butylcarbonyl-L-Asparaginsäure- γ -benzylester |
| Boc-L-Lys(Boc)-OH | = | N,N'-Di- ^t Butylcarbonyl-L-Lysin |
| Boc ₃ -Cyclen-Ac | = | 10-(2-Essigsäure)-1,4,7,10-tetra- acacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri- <i>tert</i> - butylester |
| Boc ₃ -Cyclen-EA | = | 10-(2-Aminoethyl)-1,4,7,10-tetra- acacyclododecan-1,4,7-tri-carbonsäure-tri- <i>tert</i> - butylester |
| CPK | = | Corey-Pauling-Koltun-Kalottenmodell |
| DC | = | Dünnschichtchromatographie |
| DCHA | = | N,N-Dicyclohexylamin |
| DCM | = | Dichlormethan |
| DEAE- | = | N,N-Diethylaminoethyl- |
| Dest. | = | destilliert |
| DIEA | = | N,N-Diisopropylethylamin |
| DMF | = | N,N-Dimethylformamid |
| DMSO | = | Dimethylsulfoxid |
| DQF-COSY | = | Double Quantum Filtered Correlation Spectroscopy |
| DTE | = | 1,4-Dithioerythritol |
| <i>E. coli</i> | = | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | = | Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacidic acid |
| EE | = | Ethylacetat |
| ESI | = | Elektrosprayionisation |
| EtOH | = | Ethanol |
| Ether | = | Diethylether |

| | | |
|--|---|--|
| FID | = | Free induction decay |
| Fmoc | = | 9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl-methoxycarbonylrest |
| Fmoc-L-Phe-OH | = | N-(9 <i>H</i> -Fluoren-1-ylmethoxycarbonyl)-L-phenylalanin |
| Fmoc-L-Ala-OH | = | N-(9 <i>H</i> -Fluoren-1-ylmethoxycarbonyl)-L-alanin |
| GARP | = | Globally Optimized Alternating-phase rectangular Pulses |
| Ges. | = | Gesättigt |
| Gly | = | Glycin |
| Gly-OMe·HCl | = | Glycinmethylester Hydrochlorid |
| HBTU | = | O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphate |
| HEPES | = | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure |
| HMBC | = | Heteronuclear Multiple Bond Correlation |
| HOBT | = | 1-Hydroxybenzotriazol |
| HPLC | = | High Performance Liquid Chromatography |
| HSQC | = | Heteronuclear Single Quantum Correlation |
| HV | = | Hochvakuum |
| INEPT | = | Insensitive Nuclei Enhancement by Polarisation Transfer |
| IPTG | = | Isopropylthiogalactosid |
| IR | = | Infrarotspektroskopie |
| kDa | = | kilo Dalton |
| L-Asp(O ^{<i>t</i>} Bu)-O ^{<i>t</i>} Bu·HCl | = | L-Asparagin-di- ^{<i>t</i>} butylester Hydrochlorid |
| L-Lys(Boc)-OMe·HCl | = | ε-N- ^{<i>t</i>} Butylcarbonyl-L-Lysinmethylester Hydrochlorid |
| LM | = | Lösungsmittel |
| Lys | = | Lysin |
| M | = | Molar = mol/l |
| Mant | = | 2-Methylamino-benzoyl |
| MeCN | = | Acetonitril |
| MeOH | = | Methanol |
| ML | = | Mutterlauge |
| MOPS | = | 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure |

| | | |
|--------------------|---|--|
| MP | = | Melting Point |
| MS | = | Massenspektroskopie |
| N ₂ | = | Stickstoffatmosphäre (Schutzgas) |
| NH ₄ Ac | = | Ammoniumacetat |
| NH ₄ OH | = | Ammoniak-Lösung |
| NOE | = | Nuclear Overhauser Effect |
| NOESY | = | Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy |
| OD | = | Optische Dichte |
| PE | = | Petrolether |
| Phe | = | Phenylalanin |
| PMSF | = | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| quant. | = | quantitativ = 100% Ausbeute |
| RM | = | Reaktionsmischung |
| RMSD | = | Root Mean Square Deviation |
| RF | = | Rückfluss |
| RT | = | Raumtemperatur |
| R _f | = | Retentionsfaktor |
| SC | = | Säulenchromatographie |
| SDS | = | Sodiumdodecylsulfat |
| TBAB | = | Tetra-n-butylammoniumbromid |
| TBAF | = | Tetra-n-butylammoniumfluorid |
| therm. Zer. | = | thermische Zersetzung |
| THF | = | Tetrahydrofuran |
| TPPI | = | Time Proportional Phase Incrementation |
| Tris | = | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| TROSY | = | Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy |
| UV | = | Ultraviolett |
| Val | = | Valin |
| Val-OMe·HCl | = | Valinmethylester Hydrochlorid |
| verbr. | = | verbreitert |
| wt | = | Wildtyp |

9 Anhang

Danksagung

Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer danke ich für die herausfordernde Aufgabenstellung, das hervorragende Umfeld und für die Betreuung dieser Promotionsarbeit.

Prof. Dr. B. König danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes zur Synthese der Cyclenderivate, für die zusätzliche Betreuung dieser Promotionsarbeit und für die hilfreichen Gespräche.

Dr. M. Spörner danke ich für die zahlreichen Diskussionen und Inspirationen, die Hilfestellungen bei der Einarbeitung in das Thema und für das offene Ohr, das er jederzeit für mich hatte.

Dr. J. M. Trenner, Dr. A. W. Fink, Dr. B. Domogalla, K. Baskaran, R.P. Elsner und K. J. Brunner, danke ich für die zahlreichen Diskussionen und für die schönen Stunden in der Mensa, bei der täglichen sportlichen Betätigung und abseits der Universität.

I. Rosnizeck und R. Hofweber danke ich für die stets freundliche und unterhaltsame Atmosphäre im Büroalltag.

PD Dr. W. Kremer und Dr. F. Schuhmann danke ich für die Anregungen bei Problemen im Bereich der NMR-Spektroskopie. PD Dr. W. Gronwald und N. Kachel danke ich für die Hilfestellungen bei EDV-Problemen und bei HADDOCK. Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft, die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Dem gesamten Lehrstuhl von Prof. Dr. B. König danke ich für die großartige Aufnahme während der Zeit der Synthese, für die hilfreichen Anregungen, die gemütlichen Abende beim gemeinsamen Kochen und für die Bereitstellung zahlreicher Verbindungen für die Bindungsstudien.

Den Mitarbeitern der spektroskopischen und analytischen Einrichtungen der Fakultät für Chemie der Universität Regensburg danke ich für die freundliche Zusammenarbeit bei der Durchführung der Messungen zur Ermittlung der analytischen Daten der synthetisierten Cyclenderivate.

Mein Dank geht ebenfalls an den Arbeitskreis von Prof. Dr. O. Reiser für die Möglichkeit der Benutzung des IR-Spektrometers und des Polarimeters.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei der DFG und dem Graduiertenkolleg 760 für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit bedanken.